

00346 9
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**Estudio genético, citogenético y
molecular en familias mexicanas
con retinoblastoma**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA CELULAR**

P R E S E N T A

MARINA GONZÁLEZ HERRERA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Director de Tesis: Med. Cir. Fabio Abdel Salamanca Gómez

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Dedico este trabajo a Dafne Paola, por todos los hermosos sentimientos que has despertado en mí, por toda la felicidad que nos has traído hija.

A Ubaldo, por tu paciencia, tu amor, pero sobre todo, por permitirme crecer junto a tí en todos los aspectos de nuestra vida.

A mis padres Ramón e Inés, con mucho cariño y más admiración.

A mis hermanos Alejandra, Ramón, Francisco por todo su apoyo, los quiero mucho.

A continuación los agradecimientos que si bien parecen extensos, simplemente retribuyen honor a quien honor merece.

- Agradezco al Dr. Fabio Salamanca, por darme la oportunidad de participar y aprender de una de las áreas más interesantes como lo es la genética.
- A la Dra. Virginia Palma, por enseñarme a trabajar con disciplina y responsabilidad, por su apoyo intelectual, pero sobre todo por su enorme calidad humana conmigo.
- Al Dr. Ramón Coral, por su incondicional apoyo e interés en el trabajo ¿de dónde te surge tanta iniciativa Ramón?
- A los Miembros del comité tutorial: Dra. Sara Frías, Dra. Susana Koffman por su excelente asesoría, por su disposición a colaborar en todo lo que estuvo a su alcance.
- A mis compañeras de Biología Molecular: Carolina y Rosenda, por sus aportaciones.
- A mis compañeros de citogenética: Roberto, Claudia, Areli, Maricela por su desinteresada ayuda y más por su amistad.
- A los médicos del laboratorio: Dr. Guízar, Dr. Zavala, Dra. Carmelita, por su gran disposición a colaborar.
- A mis compañeros: Ana Mari y Rosita, siempre tan lindas conmigo y tan gentiles en ayudarme, gracias chicas; a la Dra. Graciela por todo el vigor y el entusiasmo que me transmite; a Victoria por ese gran valor humano, a Luz Elena por su gran profesionalismo y eficiencia y finalmente a Antonio Rivera, por toda su colaboración.

Agradezco a las siguientes personas el apoyo recibido desde sus diferentes áreas, y que me han permitido realizar mi trabajo: Dra. Lourdes Cabrera, Dr. Mauricio Salcedo, Dr. Arturo Fajardo, Dra. Ema Chávez, Dr. Soto, Dra Margarita Valdés, Q.F.B. Verónica Madrid.

Asimismo, agradezco a los Doctores Diego Arenas y Patricio Gariglio por sus valiosas contribuciones en la revisión del trabajo.

Este trabajo de investigación se realizó en el Instituto Mexicano del Seguro Social CMN siglo XXI, a quien agradezco el apoyo económico brindado conjuntamente con la DGAPA-UNAM.

CONTENIDO	Página
Indice de figuras y tablas	iii
Abreviaturas	iv
Resumen	vii
I. INTRODUCCIÓN	
I.1 Estructura general de la retina	1
I.2 Características clínicas del Retinoblastoma	3
I.3 Genética del Retinoblastoma	4
I.4 Localización y aislamiento del gen de Retinoblastoma	10
I.5 Características y función de la proteína de retinoblastoma	12
I.6 Expresión del gen RB en tejidos humanos	16
II. JUSTIFICACION	18

III. OBJETIVOS	19
IV. HIPOTESIS	20
V. MATERIAL Y METODOS	21
VI. RESULTADOS	26
VII. DISCUSION DE RESULTADOS	49
VIII. CONCLUSIONES	65
IX. PERSPECTIVAS	66
X. BIBLIOGRAFIA	68

Índice de figuras y tablas

Número de figura	Título	Página
1	Disposición de las capas de la retina	2
2	Características histopatológicas del retinoblastoma	4
3	Mecanismos para la pérdida de heterocigocidad	7
4	Esquema del cromosoma 13	10
5	Gen del retinoblastoma humano	11
6	Modelo de la estructura de la pRB	13
7	Esquema de los dominios de la pRB	14
8	Ciclo celular dependiente de la fosforilación de pRB	15
9	Arboles genealógicos de las familias estudiadas	32
10	Metafase del complemento cromosómico 46, XX	36
11	Metafase del complemento cromosómico 47, XXY	37
12	Análisis de ligamiento con el VNTR-16 en la familia Rb-9	39
13	Análisis de ligamiento con el VNTR-16 en la familia Rb-10	40
14	Análisis de ligamiento con el VNTR-16 en la familia Rb-11	41
15	Retina normal teñida con Hematoxilina-Eosina	46
16	Inmunohistoquímica de una retina normal	46
17	Inmunohistoquímica de una retina normal, control negativo	46
18	Inmunohistoquímica de un retinoblastoma diferenciado	47
19	Inmunohistoquímica de un retinoblastoma	47
20	Inmunohistoquímica de un retinoblastoma no diferenciado	48
21	Inmunohistoquímica de un retinoblastoma con retina conservada	48

Número de tabla	Título	Página
1	Datos generales del caso índice	28
2	Observaciones de la tinción de la pRB en retinoblastomas	44

Abreviaturas

AP-1	Factor de transcripción
N-CAM	Molécula de adhesión de células neurales
Ca ⁺⁺	Ion calcio
<i>Pax 6</i>	Gen expresado en el ojo en etapas tempranas del desarrollo
<i>mi</i>	Gen de microftalmia
RB	Gen de retinoblastoma
cGMP	Guanina mono fosfato celular
LOH	Loss of Heterocycosity, pérdida de heterocigocidad
p53	Gen de la proteína p53
WT-1	Gen del tumor de Wilms
NF1, NF2	Gen de la neurofibromatosis tipo 1 y tipo 2
VHL	Gen del síndrome Hippel-Lindau
APC	Gen de la poliposis adenomatosa
DCC	Gen del cáncer de colon
13q14	Cromosoma 13, brazo q, banda 14
RB1	Locus de retinoblastoma
ADN, DNA	Acido desoxirribonucleico
cDNA	DNA complementario
mRNA	RNA mensajero
Kb	Kilobases
RFLP	Polimorfismos en el tamaño de los fragmentos de restricción
VNTR	Secuencias polimórficas repetidas en tandem
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pRB	Proteína del gen de retinoblastoma
kDa	Kilodaltones
SV40	Virus 40 del simio
ATP	Adenosin-tri-fostato
cAbl	Cinasa nuclear

G1	Gap1, en el ciclo celular
G0	Fase del ciclo celular en la cual se quedan las células diferenciadas
S	Síntesis, en el ciclo celular
E2F-1	Factor de transcripción
DP-1	Proteína
myc	Protooncogen, factor de transcripción
myb	Factor de transcripción
E7	Oncoproteína del virus del papiloma humano
HPV	Virus del Papiloma Humano
E1A	Proteína E1 de adenovirus
Ad	Adenovirus
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
p34 cdc2	Proteína cinasa dependiente del ciclo celular, tipo 2
NF-IL6	Factor de transcripción participa en inicio de diferenciación
ml	mililitros
C	Grados centígrados
M	Molar
ul	microlitros
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
pmol	picomoles
mM	milimolar
ng	nanogramos
U	Unidades
pb	pares de bases
PBS	Phosphate Buffered Saline, solución de fosfatos
X	Relación de concentración o de aumento
PRINS	Marcaje de primer <i>in situ</i>
FISH	Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia
EMISH	Hibridación <i>in situ</i> al microscopio electrónico
SSCP	Polimorfismos conformacionales de cadena sencilla

DGGE	Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante
PFGE	Electroforesis en gel de campo pulsante
MEL	Células de eritroleucemia de ratón
NSE	Enolasa específica de neurona
SAOS	Línea celular de osteosarcoma humano

RESUMEN

Aproximadamente, al 90% de los individuos afectados por retinoblastoma se les diagnostica la enfermedad antes de los 3 años, el diagnóstico temprano y el tratamiento oportuno son de importancia primordial para la sobrevivencia de los pacientes. Debido a que esta enfermedad presenta un patrón de herencia compatible con la transmisión autosómica dominante y el gen responsable de la misma es un gen supresor de tumor, el retinoblastoma ha servido como el ejemplo tipo de una predisposición genética a padecer cáncer y para establecer el modelo que propone la necesidad de dos eventos mutacionales para la formación de la neoplasia.

Con el desarrollo de métodos citogenéticos se propuso la existencia de una alteración genética en el locus 13q14, en individuos que padecen retinoblastoma y posteriormente se asignó dicha región al gen RB1. Además, se han identificado una variedad de alteraciones en este locus en pacientes con retinoblastoma y en sus tumores a nivel de DNA, RNA y proteína. La habilidad para detectar mutaciones en el gen RB, así como la identificación de secuencias polimórficas dentro del locus del gen han servido como apoyo para el asesoramiento y riesgo prenatal de desarrollar este tumor maligno pediátrico.

Por otra parte, la proteína correspondiente al gen RB1 conocida como pRB se ha encontrado expresada en todos los tejidos estudiados tanto de humanos como de rata, sugiriendo con esto una acción primordial de la misma en el control del ciclo y diferenciación celulares.

En este trabajo, se realizó un estudio genético del retinoblastoma por medio de la elaboración de árboles genealógicos en 12 familias que presentaron al menos un caso índice con retinoblastoma. De estas familias, 5 presentaron casos índice con retinoblastoma unilateral y las otras 7 con retinoblastoma bilateral; 8 familias fueron casos esporádicos y 4 tenían antecedentes de la neoplasia en la familia.

A los casos índice se les realizó un estudio citogenético por medio de bandas G de alta resolución con la finalidad de conocer que individuos presentaban pérdida 13q14. Ningún individuo presentó deleción aparente en esta banda, solo un caso índice tuvo cariotipo 47, XXY con un polimorfismo en el par de cromosomas 1.

Además, en las familias que tenían antecedentes de retinoblastoma se realizó un estudio de ligamiento por medio de la amplificación de un VNTR marcador intragénico en el locus RB1,

encontrando dos familias informativas para este locus y una familia homocigota y por lo tanto no informativa para el mismo.

Por otra parte, se hizo un estudio inmunohistoquímico con la finalidad de conocer la presencia de la proteína pRB en retinoblastomas, encontrándose presente en la mayoría de los tejidos estudiados con un patrón de tinción variable. Solo un tumor diferenciado en rosetas resultó ser negativo para la pRB.

I. INTRODUCCION

I. 1 Estructura general de la retina

De las tres capas que forman la pared del globo ocular, la retina es la capa más interna y contiene los elementos fotosensibles, se compone a su vez de 10 capas (Fig. 1), desde la más externa podemos encontrar al:

- 1) Epitelio pigmentado de la retina, importante para la integridad de los fotorreceptores (conos y bastones), participa en la renovación continua de los segmentos externos de los fotorreceptores y controla la composición de fluidos presentes en el espacio extracelular.
- 2) Segmentos externos ó elementos fotosensibles. Son prolongaciones sinápticas de células fotorreceptoras, formadas por conos y bastones.
- 3) Segmentos internos. Contienen los organelos comunes de una célula que sintetiza activamente proteínas citoplásmicas.
- 4) Capa nuclear externa. Contiene los núcleos de los conos y bastones
- 5) Capa plexiforme externa. Punto donde hacen sinapsis los fotorreceptores con las dendritas de las células bipolares
- 6) Capa nuclear interna. Contiene los núcleos de las células gliales de Müller y los de neuronas horizontales ó amácrinas.
- 7) Capa plexiforme interna. Es la región de contacto o intercambio sináptico entre células bipolares, amácrinas y ganglionares.
- 8) Capa de células ganglionares. Tiene los núcleos de este tipo de células y vasos retinianos.
- 9) Capa de fibras nerviosas retinianas (ópticas). Tiene fibras nerviosas retinianas formadas por los axones amielínicos de las células ganglionares, las células de Müller y vasos retinianos. (No se muestra en la figura 1).
- 10) Membrana limitante interna. Representa la membrana basal, hasta el nivel de las células fotorreceptoras. (No se muestra en la figura 1) (Cormack, 1987; Tortora y Anagnostakos, 1989).

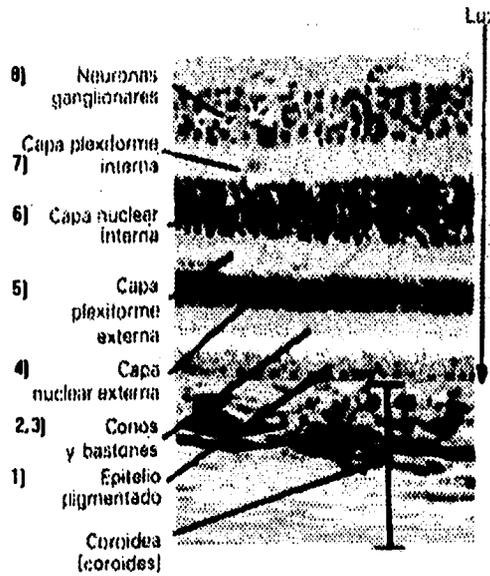


Fig. 1 Disposición de las capas de la retina. Tomado de Tortora y Anagnostakos (1989).

Se piensa que las neuronas retinianas: células gliales de Müller, neuronas horizontales, bipolares, amácrinas e interplexiformes, se originan de ancestros comunes y aunque están localizadas cerca, tienen un patrón diverso de diferenciación, lo que sugiere que la expresión selectiva de genes durante este proceso sea controlada por señales microambientales. Una de estas señales podría ser la glutamina sintetasa, expresada específicamente en las células gliales de Müller, su expresión muestra un patrón dependiente del desarrollo y la transcripción de su gen está controlada por la hormona glucocorticoide. Además se ha propuesto que la interacción del factor de transcripción AP-1 con el receptor de la hormona glucocorticoide está involucrado en la regulación de la actividad de dicho receptor. Así, los cuatro tipos neuronales participan en el desarrollo de fibras nerviosas pero tienen diferencias en la morfología de sus procesos neuríticos (Adler y Farber, 1986; Kodama y Eguchi, 1994).

Se han propuesto dos modelos en relación a las señales que promueven la diferenciación de capas de la retina. A) Uno de ellos es el de clasificación entre tipos celulares (cell sorting), éste involucra interacciones entre células vecinas: se ha observado que la fracción celular derivada de células ganglionares prefiere asumir una posición cortical alrededor de un centro de células de otras fracciones, esto es muy semejante a las estructuras

características observadas en retinoblastomas y sugiere que hay preferencias de unión interfaciales (entre las diferentes caras celulares) así como de unión homotípica (del mismo tipo celular). Las proteínas propuestas que participan en las interacciones celulares y que tienen funciones adhesivas son la molécula de adhesión de células neurales (N-CAM), la cognina y mecanismos de adhesión dependientes de Ca^{++} (Adler y Farber, 1986).

B) El segundo modelo es el de especificación celular. Existen estudios en diferentes vertebrados que han indicado que las células que se irán a diferenciar en células ganglionares son las primeras en dejar el ciclo celular y los tipos remanentes siguen una secuencia de diferenciación especie-específica. De entre los genes propuestos en el desarrollo y diferenciación de células oculares están los *Pax 6*, el *mi* y el de *RB* (Adler y Farber, 1986; Lee *et al.* 1994; Graw, 1996).

Por otra parte, se sugiere que hay periodos en la vida de una célula fotorreceptora en los cuales es vulnerable a factores genéticos o ambientales, sobre todo durante la diferenciación o en la renovación de sus segmentos externos (después de la diferenciación). Entre estos factores podemos ejemplificar a los que causan la retinitis pigmentosa, enfermedad caracterizada por degeneración de células fotorreceptoras debido a mutaciones que afectan proteínas necesarias en la transducción de señales, se asume que mutaciones en el gen de la cGMP-fosfodiesterasa, en el de la opsina y en el de la periferina causan algunas formas de retinitis pigmentosa (Adler y Farber, 1986; Kodama y Eguchi, 1994).

1. 2 Características clínicas del Retinoblastoma

Dentro de los desórdenes genéticos de la retina se encuentra el Retinoblastoma, el tumor intraocular más común en la niñez que ocurre con una frecuencia de 1 en 20,000 niños nacidos vivos (Knudson, 1993).

Las células tumorales que dan origen al Retinoblastoma parecen originarse de precursores de células retinales, es decir, de retinoblastos que normalmente se diferencian como células de las capas neuroblásticas interna y externa de la retina y que posteriormente darán origen a las diez capas que conforman una retina madura (Fig 1). El crecimiento del tumor a partir de los retinoblastos no diferenciados tiende a ser nodular, con nódulos de siembra que paulatinamente llenan el ojo y se extienden a través del nervio óptico hacia el

cerebro; puede invadir el cuerpo ciliar e irrumpir el globo anterior y formar una masa epibulbar o invadir la coroides y por medio de la esclerótica, llegar hacia los tejidos de la órbita. Entre los signos más tempranos de retinoblastoma se encuentra el estrabismo del ojo afectado y la presencia de un halo blanquecino en la pupila conocido como leucocoria (Shields, 1992).

Un tumor bien diferenciado se reconoce histológicamente por la presencia de rosetas Flexner-Wintersteiner que son células columnares arregladas alrededor de una luz central y en algunos casos también se observan rosetas de Homer-Wright, que son células en arreglo radial alrededor de fibras neurales (Fig. 2). Es frecuente observar también áreas de necrosis y calcificación (Stephen, 1980; Gallie *et al.* 1990; Shields, 1992)

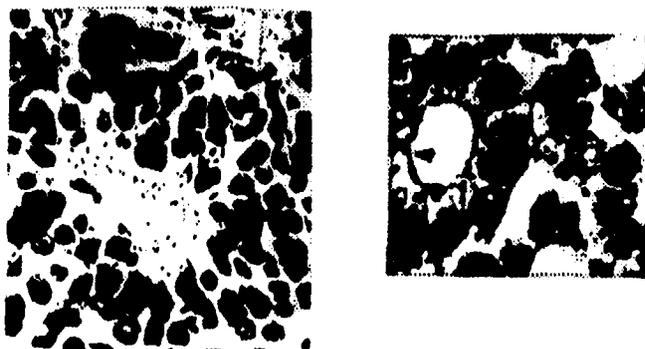


Fig. 2. Características histopatológicas del retinoblastoma. Izquierda, rosetas de Homer-Wright; derecha, rosetas de Flexner-Wintersteiner de un tumor de retinoblastoma bien diferenciado. Tomado de Shields (1992).

1.3 Genética del Retinoblastoma

Este padecimiento se presenta en dos formas: unilateral y bilateral, en casos unilaterales, el tumor se diagnostica en promedio a los 23 meses, en casos bilaterales los signos aparecen más temprano, a los 12 meses en promedio. Aproximadamente en el 30% de los pacientes, el retinoblastoma es bilateral y en el resto se presenta la condición unilateral. De estos individuos se ha calculado que cerca del 20% pueden desarrollar más tarde la enfermedad en el segundo ojo. Se considera que del total de casos con retinoblastoma, 5 a 10% son

heredados, 20 a 30% se adquieren por mutaciones nuevas en células germinales y 60 a 70% son esporádicos debido a mutaciones somáticas en las células de la retina (Vogel, 1979; Abramson *et al.* 1982).

La mayoría de los casos unilaterales son esporádicos y no existe historia familiar de la enfermedad, sin embargo se estima que el 10% de casos unilaterales son hereditarios.

En los casos bilaterales, el patrón de transmisión es compatible con la herencia autosómica dominante, en este caso un progenitor y uno o más niños están afectados de manera bilateral o unilateral, aunque en algunos casos se presenta el fenómeno de no penetrancia.

La transmisión colateral es otro patrón de herencia y se presenta cuando dos o más miembros de la misma generación están afectados sin transmisión directa de padre a hijo, hay expresividad variable y se da la no penetrancia en el padre que no padece la enfermedad pero cuyos hijos sí la presentan; este tipo de herencia también puede manifestarse cuando el gen implicado está en forma de mosaico germinal (Sorsby, 1972; Carlson *et al.* 1979; Zhu *et al.* 1989).

Para explicar la transmisión del retinoblastoma compatible con la herencia autosómica dominante, Knudson (1971) propuso el evento de la doble mutación para transformar una célula normal en cancerosa. Para ello, presentó datos estadísticos de 48 casos que permitieron establecer la siguiente hipótesis, para el desarrollo de retinoblastoma se requieren 2 eventos mutacionales: cuando éste padecimiento es familiar, la primera mutación debe ocurrir en células germinales de alguno de los progenitores (mutación precigótica), así el individuo hereda dicha mutación y la presenta de forma constitucional (tanto en células somáticas como germinales) por lo cual se le conoce como heterocigoto para el gen RB pero no desarrolla la neoplasia; la segunda mutación debe ocurrir en las células de la retina (mutación somática) en este caso, el individuo se verá afectado y se dice que hubo pérdida de heterocigocidad (LOH, por sus siglas en inglés). Cuando la tumoración es esporádica, las dos mutaciones suceden en las células retinianas. Además, por estimaciones estadísticas se sabe que la penetrancia para el retinoblastoma es de 90% y la expresividad de la mutación es variable (Carlson *et al.* 1979; Naumova y Sapienza, 1994).

A nivel celular, el retinoblastoma se desarrolla como consecuencia de alteraciones en ambos alelos del gen RB del par de cromosomas 13 humanos dentro de la banda

cromosómica q14.1 lo cual explica que a nivel molecular se comporta como una enfermedad autosómica recesiva, debido a que un individuo que es heterocigoto para el gen de retinoblastoma, no se verá afectado ya que existe el otro alelo normal del gen supresor. Sin embargo, la falta de dicho alelo normal conducirá al individuo a la condición homocigota (o pérdida de heterocigocidad) para la mutación y se desencadenará el proceso de carcinogénesis en la retina.

Los genes supresores de tumor son aquellos que codifican proteínas inhibidoras del crecimiento y cuya pérdida, durante la tumorigénesis, permite la proliferación desregulada de la célula. Se han aislado ocho genes supresores de tumor distintos por medio de clonación molecular: el gen de retinoblastoma (RB), el de p53 (p53), el del tumor de Wilms (WT-1), el de la neurofibromatosis tipo 1 (NF1) y el tipo 2 (NF2), el del síndrome Hippel-Lindau (VHL), el de la poliposis adenomatosa (APC) y el del cáncer de colon (DCC). Este tipo de genes también se conocen como antioncogenes debido a que la pérdida de ambos alelos o su inactivación son los eventos que originan el tumor (Huebner y Todaro, 1969; Murphree y Benedict, 1984; Hinds y Weinberg, 1994).

Adicionalmente, se ha observado que algunos individuos que padecieron retinoblastoma y que heredaron un alelo mutante en el locus 13q14, tienen elevadas posibilidades de desarrollar neoplasias secundarias, la más común es el osteosarcoma, la cual se piensa que es causada por una alteración en el mismo gen; también se presentan con menor frecuencia los fibrosarcomas y los melanomas (Abramson *et al.* 1984; Friend *et al.* 1986; Gallie *et al.* 1990; Saenz *et al.* 1995). Friend *et al.* (1986, 1987) aislaron un segmento de cDNA que detectó segmentos cromosómicos del gen RB, el cual al ser usado en retinoblastomas y osteosarcomas no evidenció transcritos de RNA en ninguno de los dos tipos tumorales, lo que sugirió que en su etiología existía un elemento genético común. Toguchida *et al.* (1989) encontraron en pacientes con osteosarcoma no hereditario, dos mutaciones somáticas en el gen RB1, la primera mutación afectó con mayor frecuencia el gen localizado en el cromosoma 13 de origen paterno. Estos hechos y las evidencias de la formación de un tumor secundario en un órgano separado de la retina incrementaron el interés para realizar estudios de cambios frecuentes en el gen RB en genomas de tumores diferentes a retinoblastomas (Feugeas *et al.* 1996).

Los mecanismos propuestos para la pérdida de heterocigocidad que pueden desencadenar la oncogénesis en un individuo con un alelo del gen de retinoblastoma previamente alterado, son los siguientes (Fig. 3) (Cavenee *et al.* 1983; Muller y Scott, 1992):

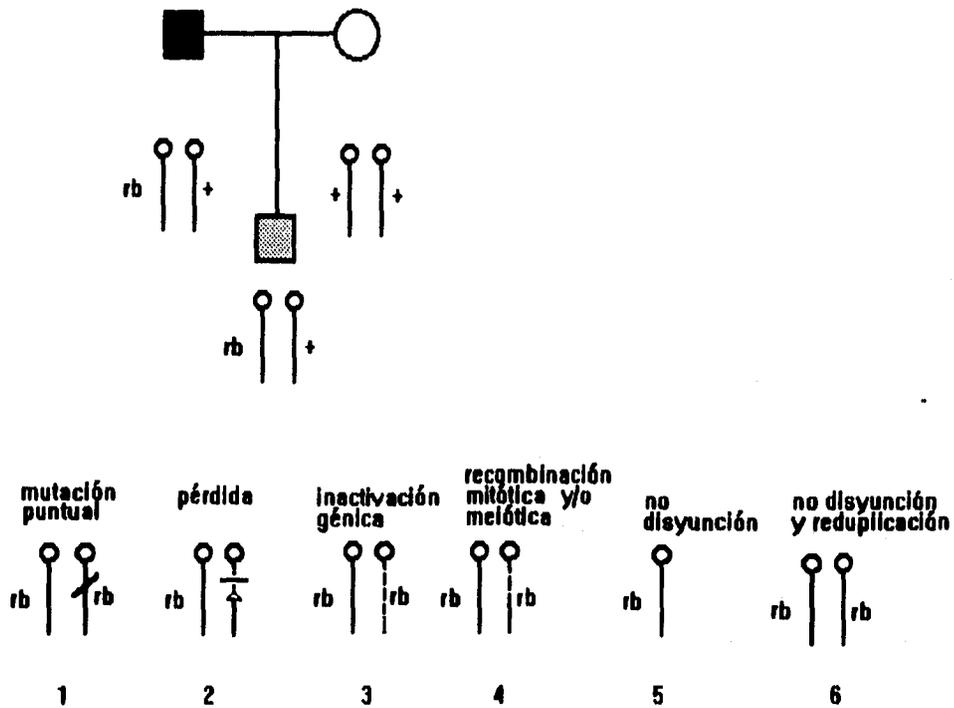


Fig. 3. Mecanismos propuestos que pueden inducir la pérdida de heterocigocidad para que un individuo desarrolle retinoblastoma. Tomado de Cavenee *et al* (1983).

- 1) Mutación en el locus de retinoblastoma. Este podría involucrar la sustitución, pérdida ó inserción de un solo par de bases hasta una secuencia de varias de ellas
- 2) Pérdida cromosómica que comprenda el locus de retinoblastoma. Se ha visto que la región del cromosoma 13 que esta ausente en niños con predisposición al tumor se localiza en la

región q13.1 - q14.5 en donde se incluye el locus para retinoblastoma ubicado específicamente en 13q14.1.

3) Inactivación génica. Aquí podrían estar involucrados mecanismos como hipermetilación cerca de las regiones promotoras, disparada por algunos eventos durante la gametogénesis.

4) Recombinación mitótica y/o meiótica. En el primer caso se ha contemplado la posibilidad de recombinación entre el locus mutante de retinoblastoma y el normal que al segregarse puede resultar una célula que mantiene heterocigotidad en el locus proximal al punto de ruptura de la recombinación pero es homocigoto en el locus distal de este punto. En cuanto a recombinación meiótica se propone la existencia de un evento regionalizado de recombinación que conlleve a la inactivación del alelo normal.

5) No disyunción mitótica y pérdida del cromosoma normal. En este caso las células quedarían en condición hemicigota conteniendo el locus afectado.

6) No disyunción y reduplicación del cromosoma afectado.

Otras observaciones interesantes respecto a la genética del retinoblastoma se obtuvieron a partir del estudio de Dryja *et al.* (1989) con fragmentos polimórficos de longitud variable (RFLP) en este trabajo demostraron que las mutaciones en el gen RB1 de individuos con retinoblastoma ocurrieron con mayor frecuencia en células germinales de origen paterno. De la misma forma, en el trabajo de Zhu *et al.* (1989) realizado en tumores de retinoblastoma, se encontró que 4 de 5 pacientes con RB bilateral retuvieron el alelo paterno RB1, lo que sugirió que las mutaciones germinales nuevas en RB1 ocurren más frecuentemente durante la espermatogénesis que durante la oogénesis. Kato *et al.* (1994) hicieron un análisis de segregación de regiones polimórficas dentro y fuera del gen RB y determinaron el origen parental del alelo perdido en los tumores. Se identificaron los haplotipos asociados con mutaciones en el gen RB y se encontró una preferencia del alelo paterno para la mutación en la línea germinal, lo que sugirió que la espermatogénesis puede estar asociada con más alto riesgo que la oogénesis debido a una mayor velocidad en las divisiones celulares involucradas en la primera o quizá a factores ambientales y deficiencia en la reparación del ADN del esperma. Ambos hechos pueden ser importantes para ocasionar mutaciones preferencialmente en la línea

germinal del alelo paterno. Los estudios anteriores sirvieron como antecedente para proponer que en el retinoblastoma se pudiera presentar el fenómeno de impronta génica ó "imprinting".

Munier *et al.* (1994) observaron recientemente que aunque varios estudios reportan distorsión de sexos en la segregación de retinoblastoma, no hay datos suficientes que confirmen el hecho de una transmisión asimétrica respecto al sexo en retinoblastoma heredado y consideran que debe tomarse en cuenta para la estimación de la segregación, tanto la paternidad como la penetrancia incompleta. Al hacer referencia al trabajo de Naumova y Sapienza (1994) encontraron 'factores de complicación' como la distorsión de sexos tanto para individuos afectados contra no afectados así como para la proporción total de sexos (hombres, mujeres) y comentan que $\frac{1}{4}$ de los datos en este trabajo no estan publicados ni disponibles para revisión.

Naumova y Sapienza (1994), hicieron una propuesta reciente e interesante respecto al fenómeno de impronta génica para lo cual realizaron un estudio epidemiológico y genético del retinoblastoma y observaron una desproporción en los sexos siendo los varones los que desarrollaron la neoplasia con mayor frecuencia cuando el padre presentó la enfermedad de manera bilateral esporádica. Una posible explicación a esta desproporción es la existencia de un proceso capaz de actuar en trans y dar sensibilidad al origen parental de los alelos, este proceso sería la impronta génica. La hipótesis que sugirieron fué que los varones con retinoblastoma bilateral esporádico llevan un gen defectuoso de impronta en su cromosoma X, por lo que son incapaces de borrar la impronta materna y reestablecer la impronta paterna, además tienen un gen RB alterado en uno de sus cromosomas. De acuerdo con las posibilidades de formar embriones, sólo serán viables aquellos que tengan un cromosoma Y (por lo tanto serán varones) y que tengan un alelo RB-1 alterado (y al estar en condición heterocigota tendrán mayores probabilidades de desarrollar retinoblastoma).

Otra posible hipótesis para explicar los hallazgos en la desproporción de sexos en la segregación de retinoblastoma es que la impronta génica hace al gen RB1 de origen paterno más susceptible a mutaciones durante el desarrollo. Greger *et al.* (1994) utilizaron un análisis de metilación en el gen RB y reportaron que en 3 tumores de retinoblastoma se encontró el alelo paterno metilado lo que probablemente sugiere causas de impronta génica respecto a hipermetilación preferencial de dicho alelo.

1.4 Localización y aislamiento del gen de retinoblastoma

Las observaciones citogenéticas de células tumorales y en ocasiones de linfocitos de sangre periférica de pacientes con retinoblastoma, han mostrado en varios casos deleciones que incluyen el brazo largo del cromosoma 13 ó exclusivamente en la región que comprende la banda q14, por lo cual se asoció esta alteración con el desarrollo de dicha neoplasia (Knudson *et al.* 1976; Yunis y Ramsay, 1978). Más tarde, el locus genético que determina susceptibilidad a retinoblastoma fué asignado a la banda q14 del cromosoma 13, junto al gen de la enzima esterasa D, por lo cual dicha enzima se utilizó como un marcador bioquímico, en análisis de ligamiento para dar consejo genético (Sparkes *et al.* 1980; Sparkes *et al.* 1983; Mukai *et al.* 1984). De esta forma, los conocimientos de citogenética y genética molecular permitieron localizar este gen en la banda q14.1 del cromosoma 13, el cual se conoce como gen RB y cuyo locus se denomina RB1 (Fig. 4).

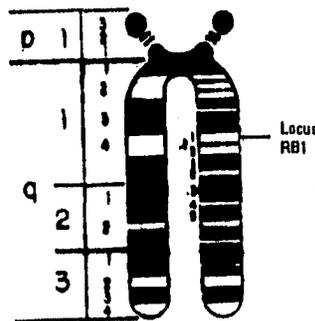


Fig. 4. Esquema del cromosoma 13 donde se muestra la ubicación del gen de retinoblastoma (RB) en el locus RB1, que abarca la región q14.1. Tomado de Yunis y Ramsay (1978).

Con estos antecedentes, la primera aproximación al conocimiento del gen de retinoblastoma, se obtuvo utilizando la técnica de caminando sobre el cromosoma (chromosome walking) y se usó como sonda de referencia un DNA complementario (cDNA) del gen de la esterasa D, el cual se había encontrado ligado a la enfermedad. Mediante ello, se identificaron 2 clonas de cDNA del gen de retinoblastoma que se sobrelapan, la RB-1 de 1.6

kb y la RB-2 de 0.9 kb. La sonda Rb-1 se utilizó para detectar transcritos haciendo evidente un mRNA de 4.7 Kb en tejidos normales, mientras que en retinoblastomas, detectó transcritos acortados de aproximadamente 4.0 kb o hubo ausencia de ellos. Una vez obtenido el cDNA del transcrito de 4.7 Kb, se procedió a secuenciarlo, con lo cual también se pudo predecir la secuencia de la proteína del gen RB. De esta forma, el gen de retinoblastoma fué el primer gen supresor de tumor clonado y caracterizado (Friend *et al.* 1986; Lee *et al.* 1987).

El gen RB se extiende sobre 200 Kilobases (Kb) de DNA, consta de 27 exones y 26 intrones, al transcribirse origina un mRNA de 4.7 kb (Lee *et al.* 1987; McGee *et al.* 1989) (Fig. 5).

Las características del promotor del gen RB lo engloban dentro de los genes de mantenimiento celular ó "housekeeping", lo cual explica en parte que esté presente en todos los tejidos normales que se han estudiado. La transcripción tiene 3 sitios posibles de inicio en +1, +44 y +51 bases. En la secuencia que precede al sitio de transcripción +1 no se encuentran las cajas TATA y CCAAT de muchos genes, esta posición es rica en Guaninas-Citocinas (islas CpG) que constituyen un 68% del total de bases en la región (Hung *et al.* 1989; Zacksenhaus *et al.* 1993; Othani-Fujita *et al.* 1994).

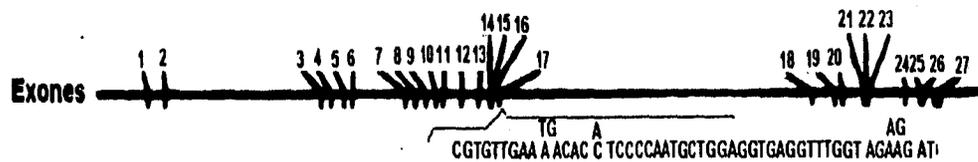


Fig. 5. Gen de retinoblastoma humano. Los 27 exones se transcriben en un mRNA de 4.7 Kb. En el intron 16 se localiza una de las regiones con número variable de secuencias repetidas en tandem (VNTRs) que van de 50-53 pb. Tomado de Wiggs *et al.* (1988) y Yandell y Dryja (1989).

Otra de las características determinantes en el gen RB es la presencia de polimorfismos en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLPs) y de secuencias polimórficas repetidas en tandem (VNTRs) en los intrones 2, 3, 16, 20 y 26 (Wiggs *et al.* 1988; Yandell y Dryja, 1989). En su conjunto, estos marcadores han servido como métodos para predecir el genotipo

y el riesgo de padecer el tumor en familiares de pacientes afectados. Los VNTRs informativos en el gen de retinoblastoma utilizados en análisis de segregación hasta la fecha han sido los que se localizan en el intron 16 con la repetición común de 50-53 pares de bases en longitud (Wiggs *et al.* 1988; Scharf *et al.* 1992) y en el intron 20 con la repetición CTTT(T) entre 14 a 26 veces (Brandt *et al.* 1992).

Actualmente, con el aislamiento del gen RB y el desarrollo de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se ha utilizado la amplificación de los VNTRs como un método rápido y sencillo en estudios de ligamiento para identificar individuos portadores del gen que predispone a retinoblastoma en apoyo al asesoramiento genético (Nakamura *et al.* 1987; Brandt *et al.* 1992; Lohmann *et al.* 1992; Scharf *et al.* 1992).

Por otra parte, ya se ha reportado la correlación entre estudios citogenéticos y amplificación de VNTRs (Wiggs *et al.* 1988). Se encontró que cuando un individuo presenta una delección en uno de sus cromosomas 13 que involucra varios cientos de pares de bases, como es un cariotipo 13q14, del(13)(q14.1q14.3) (Wilson *et al.* 1987 en Wiggs *et al.* 1988) y se le analiza para el VNTR, presenta ausencia del mismo en uno de sus alelos debido a la delección de este locus.

1.5 Características y función de la proteína de retinoblastoma

La secuenciación del cDNA del gen RB predice una proteína (pRB), con características de unión a ácidos nucleicos. La pRB consta de 928 aminoácidos, se puede encontrar en 2 formas durante el ciclo celular: hipofosforilada, con un peso de 105 kDa o en su estado hiperfosforilado entre 110-116 kDa (Fig. 6) (Friend *et al.* 1986; Stokke *et al.* 1993).

La pRB está formada por 6 dominios (Fig.7): el dominio amino terminal que abarca los aminoácidos 1 al 379; el dominio A, va de los aminoácidos 379 al 572; el dominio B que consta de los aminoácidos 646 al 772, a su vez estos dos forman el dominio "pocket" A/B el cual abarca los aminoácidos de 379 al 869 y adicionalmente, entre A y B existe una región a la que se le ha llamado dominio inserto (ID) que incluye los aminoácidos 572 al 646; por último el dominio carboxi terminal abarca los aminoácidos 772 al 928 (Welch y Wang, 1995).

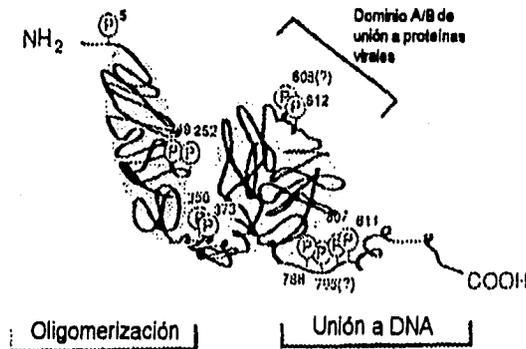


Fig. 6. Modelo de la estructura de la pRB. P representa los sitios de fosforilación en serinas o treoninas. Los óvalos oscuros son regiones resistentes a proteasa. Los dos óvalos hacia el extremo carboxilo corresponden al dominio de unión de proteínas virales tal como el antígeno T de SV40. Tomado de Cobrinik *et al.* (1992).

Algunos dominios de la proteína pRB tienen la capacidad de unirse a proteínas celulares y de esta manera inhibir la actividad de éstas en el ciclo celular. La región carboxi terminal de pRB interactúa con el sitio de unión a ATP de la tirosina cinasa nuclear cAbl en la fase G1 y G0, de esta forma la actividad de tirosina cinasa se abate. Cuando las células progresan a fase S, pRB se desfosforila, c-Abl se libera y la actividad de tirosina-cinasa continúa (Kaelin *et al.* 1991; Zacksenhaus *et al.* 1993; Welch y Wang, 1995).

El factor de transcripción E2F-1 se une a pRB por medio de un dominio de unión a pRB localizado en su extremo carboxi-terminal que consta de 18 aminoácidos, dicha unión requiere los dominios pocket A/B de pRB y el dominio carboxi-terminal, específicamente en los residuos 785-806 de este último; se ha visto que esta unión se estabiliza a través de la heterodimerización de E2F con la proteína DP-1, de esta manera, pRB inhibe la actividad de E2F y evita la activación de ciertos genes que están involucrados en la progresión de la célula hacia fase de síntesis y que de otra forma serían activados por E2F, tales como el gen de la timidina cinasa, el gen myc, el myb, el de la dihidrofolato reductasa y el de la DNA polimerasa α , con ello, la pRB ejerce su actividad de reprimir el ciclo celular (Nevins, 1992; Graña y Reddy, 1995; Cobrinik *et al.* 1996).

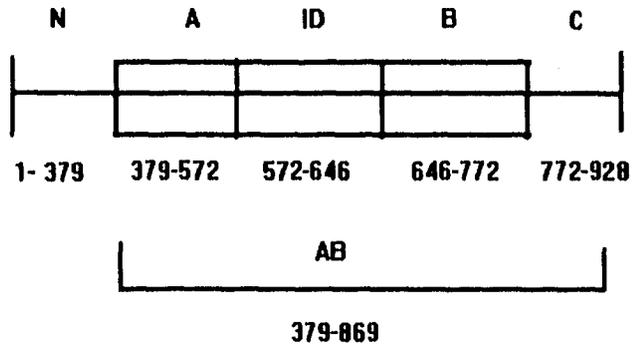


Fig.7. Esquema de los dominios de la pRb. Las letras representan la denominación de cada uno de los dominios, en total 6; los números indican el rango de aminoácidos que abarca cada dominio. Tomado de Welch y Wang (1995).

Por otra parte, también se ha observado que los dominios pocket A/B y el dominio B, interactúan con las proteínas virales E7 del Virus del Papiloma Humano (HPV) tipo 16 y la proteína E1A del Adenovirus (Ad). Ambas proteínas, al igual que la del antígeno T de SV40, forman complejos con la forma hipofosforilada de la pRB y la inactivan permitiendo la progresión del ciclo celular y tienen de esta forma actividad mitogénica y pueden inducir la síntesis de ADN en células que están en G1 ó G0 (Levine, 1992).

La pRB presenta residuos de serina y treonina los cuales son blanco para la fosforilación (Fig. 6). El grado de fosforilación de pRB se regula por cinasas dependientes de ciclinas (CDK). Cada cinasa (de la familia p34 cdc2) parece activarse en ciertas fases del ciclo celular y sus actividades catalíticas y especificidad del sustrato parecen estar determinadas por las ciclinas que actúan como subunidades reguladoras y que al activar las CDK a su vez promueven la fosforilación de ciertos sustratos. La ciclina E es responsable de iniciar la fosforilación de pRB y la ciclina A, de mantener el estado hiperfosforilado de pRB (Hamel *et al.* 1992; Goodrich y Lee, 1993; Stokke *et al.* 1993).

La pRB actúa para limitar o suprimir el crecimiento, inhibiendo la progresión del ciclo celular. De esta manera forma parte de las señales ambientales que funcionan como factores antimitogénicos al bloquear la proliferación en respuesta a señales inhibitorias del crecimiento. Si una célula pierde la función de pRB, continúa recibiendo señales inhibitorias pero es incapaz de responder adecuadamente y prolifera descontroladamente (Hamel *et al.* 1992).

Al emerger de mitosis (fase M) (Fig.8), la célula puede salir del ciclo celular y permanecer en fase G0 por acción de pRB hipofosforilada (en células que no se vuelven a dividir) o en el caso de células que tienen actividad mitótica continua, pRB hipofosforilada bloquearía el crecimiento evitando la salida de G1 si no existen condiciones externas que promuevan la progresión hacia fase S, de otra forma la célula activaría una cinasa (quizá cdc2) para fosforilar pRB y así promover el ciclo celular. Se propone que pRB en su estado hipofosforilado se une al factor de transcripción celular E2F inactivándolo y de esta forma reprime la transcripción de genes que estimulan el crecimiento, por el contrario, al unirse pRB con la cinasa se hiperfosforila y libera a E2F activando dichos genes. Así, las células altamente diferenciadas de la retina como son los fotorreceptores y las neuronas, permanecen en estado G0 donde la pRB esta hipofosforilada y quizá controla la diferenciación celular o actúa como punto de restricción en G1 (Cobrinik *et al.* 1992; Weinberg, 1992). Alteraciones en la función de pRB podrían ocasionar que los tumores se originen de precursores inmaduros de células retinianas y tal vez gliales y por lo tanto su pérdida originaría una falla en la diferenciación de éstos y la proliferación continua de células inmaduras.

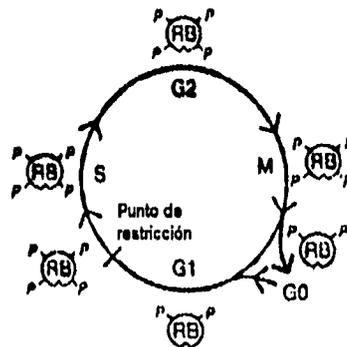


Fig. 8. Ciclo celular dependiente de la fosforilación de la pRB. En fase G1 temprana y media, pRB se encuentra en estado hipofosforilado y evita la progresión del ciclo celular, se hiperfosforila en fase G1 tardía para que la célula progrese a fase S y complete el ciclo celular. Tomado de Cobrinik *et al.* (1992).

Debido a que múltiples proteínas se unen a pRB, ésta puede tener funciones múltiples y/o únicas en tejidos diferentes: una función común en la proliferación celular y una función especializada en la diferenciación celular. Tejidos como la retina que entran en G0 irreversible y desarrollan fenotipo altamente diferenciado pudieran depender críticamente de la función de diferenciación de pRB, mientras que mecanismos redundantes para el control del ciclo celular pueden estar presentes en tejidos de proliferación rápida haciéndolos menos susceptibles a la transformación cuando el gen de retinoblastoma se altera en el genoma (Hamel *et al.* 1992; Weinberg, 1992; Goodrich y Lee, 1993).

Por otra parte se ha observado que la pRB tiene diferentes afinidades de unión a CDK's que participan en la regulación el ciclo celular dependiendo de su grado de fosforilación (Mittnacht *et al.* 1994). Además de esta función, se ha visto que pRB promueve la diferenciación celular activando otra clase de factores de transcripción, como el NF-IL6, en ratón, que actúa en los estadios finales de la diferenciación celular (Chen *et al.* 1995). A este respecto, se ha visto la participación de pRB en diferenciación celular principalmente en tejido nervioso y eritropoyético de embriones de ratón. Por lo cual se propone que en estos tejidos, su función como factor regulador del ciclo celular es actuar como transductora de señales entre la sincronización del ciclo celular y la maquinaria transcripcional, permitiendo el control coordinado de la expresión de conjuntos de genes que intervienen en el crecimiento de las células (Lee *et al.* 1994; Weinberg, 1995).

1.6 Expresión del gen RB en tejidos humanos

La fosfoproteína codificada por el gen de retinoblastoma parece jugar un papel central en la división celular y la diferenciación como lo sugieren las observaciones hechas en tejidos humanos normales acerca de la expresión de pRB. Por estudios inmunohistoquímicos en tejidos como epitelio estratificado de la mucosa cervical, epitelio simple de tiroides, glándulas suprarrenales, pulmón, hígado y riñón, células de tejido nervioso, ojo y células hematopoyéticas entre otros, se ha encontrado que pRB se expresa en todos los tejidos normales estudiados. Sin embargo se ha visto heterogeneidad en su expresión dependiendo del estrato celular en donde se observe o de la proporción de proliferación y estado de maduración celular en el epitelio. En

la retina del ojo normal, la capa interior que incluye células ganglionares y amacrinias tienen un patrón inmunorreactivo más intenso. La capa externa compuesta de células fotorreceptoras, muestra un patrón de tinción débil y heterogéneo (Cordon-Cardo y Richon, 1994).

Los patrones alterados de la expresión de pRB se han asociado con formas diferentes de cáncer humano. Se ha visto que los tumores benignos y de cáncer de invasión temprana expresan altos niveles de pRB. También se ha reportado, por métodos cualitativos de inmunohistoquímica y cuantitativos por Southern, Northern y Western blot, que en sarcomas altamente invasivos de estado tardío, los niveles de pRB son de bajos a no detectables, correlacionando con un pronóstico clínico desfavorable (Cance *et al.* 1990) lo mismo se ha observado en cáncer de células pequeñas de pulmón (Hensel *et al.* 1990) y en carcinomas primarios de células no pequeñas de pulmón (Xu *et al.* 1991), carcinoma hepatocelular (Zhang *et al.* 1994) así como para cáncer de mama (Lee *et al.* 1988).

Por otra parte, existen también reportes en donde los hallazgos no indican que exista una correlación entre la pérdida de la proteína pRB y el cáncer, como en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de ovario, leucemia crónica (Yoo *et al.* 1994) o bien, tampoco hay una correlación entre la sobreexpresión observada de pRB y melanomas invasivos (Saenz-Santamaría *et al.* 1995) esto sugiere que en algunos casos, para que se desarrolle el cáncer deben ocurrir eventos adicionales en otros cromosomas además del 13q14 o bien que la alteración de pRb pudiera ser una consecuencia y no una causa directa del origen de la neoplasia.

Adicionalmente, a la fecha sólo existe un reporte enfocado a conocer la expresión de la pRB en retinoblastomas. En este estudio se encontró que la proteína pRB no se expresa en dichos tumores (Yuge *et al.* 1995) sin embargo es importante ahondar en este tipo de estudios si se considera que diferentes mutaciones sobre el gen RB pueden tener diferentes efectos a nivel de transcripción y esto puede repercutir en la expresión parcial, total o nula de la proteína correspondiente (Dunn *et al.* 1989).

II. JUSTIFICACION

En México existen varios estudios clínicos y genéticos sobre retinoblastoma, sin embargo son pocos los trabajos en los cuales se ha abordado este padecimiento desde el punto de vista citogenético y de biología molecular. Por otra parte, el diagnóstico de retinoblastoma se lleva a cabo mediante exámenes oftalmológicos en individuos que se sospecha pueden desarrollar el tumor; este tipo de análisis implica someter tanto a los individuos sin predisposición como con predisposición a una revisión oftalmológica continua que requiere el uso de anestesia. Por otra parte, datos de la literatura indican que existe un bajo porcentaje de individuos que presentan pérdida en la región q14 del cromosoma 13 observable por métodos de citogenética. Por lo tanto, la implementación de métodos moleculares de diagnóstico serían de gran ayuda para identificar aquellos individuos que heredaron la predisposición a sufrir este padecimiento y realizar únicamente en ellos los exámenes oftalmológicos, evitando así, los inconvenientes del examen en los individuos que no tienen la predisposición.

Una alternativa para realizar esto es mediante pruebas de ligamiento utilizando marcadores polimórficos tipo VNTRs localizados en algunos intrones del gen RB.

Por otra parte, es importante conocer la presencia o ausencia de la proteína de retinoblastoma en el tejido tumoral con la finalidad de observar su fenotipo en una célula neoplásica y predecir a qué nivel pudiera estar alterada.

III. OBJETIVOS

1) Elaborar los árboles genealógicos a partir de información obtenida de familias mexicanas que presenten al menos un individuo con retinoblastoma y que hayan aceptado participar en la investigación con la finalidad de realizar un estudio genético.

2) Determinar, utilizando técnicas de bandeado de alta resolución, las alteraciones citogenéticas en células de linfocitos de sangre periférica de pacientes con retinoblastoma y familiares en primer grado, considerando especialmente la delección en la banda q14.1 del cromosoma 13.

3) Amplificar, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el número variable de secuencias repetidas en tandem (VNTRs) en el intrón 16 a partir de DNA de linfocitos de sangre periférica en individuos afectados y en familiares de primer grado.

4) Identificar la presencia de la proteína de retinoblastoma (pRB) y su localización en cortes histológicos de ojos con Retinoblastoma, por medio de inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo policlonal que detecte tanto la forma hipofosforilada como hiperfosforilada de la proteína pRB

5) Mejorar la información del asesoramiento genético a través de los estudios citogenéticos y de ligamiento con secuencias polimórficas del gen RB.

IV. HIPOTESIS

1) El análisis de los arboles genealógicos de familias con retinoblastoma dará los elementos necesarios que permitan inferir la genética de la neoplasia.

2) Debido al bajo porcentaje de individuos con retinoblastoma que presentan pérdidas de material genético en la región 13q14 observables por citogenética, es poco probable que se encuentren alteraciones a este nivel en los cromosomas de los pacientes estudiados.

3) Ya que las secuencias tipo VNTR son marcadores que presentan un alto grado de polimorfismo y de heterocigocidad, podrían servir como elementos útiles para identificar a los individuos que han heredado la predisposición a padecer retinoblastoma así como ser usados en estudios de ligamiento en familias mexicanas con antecedentes de la enfermedad.

4) Dado que la proteína de retinoblastoma pRB participa en la regulación del ciclo celular evitando que se desarrolle el proceso de carcinogénesis, es posible que no se detecte en la mayoría de los retinoblastomas estudiados.

V. MATERIAL Y METODOS

1) Individuos

El estudio se realizó en 12 familias en las cuales se detectaron individuos con retinoblastoma unilateral o bilateral. Los pacientes acudieron a los servicios del Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI, IMSS y al Departamento de Genética del Hospital General de México, SSA durante el periodo de 1994-1996. Se llevó a cabo la revisión de los expedientes correspondientes para conocer los antecedentes oftalmológicos de los casos índice y la forma en que se diagnosticó el padecimiento, así como para obtener información sobre los antecedentes familiares. Además, se realizó una entrevista directa con los padres de los afectados debido a que la mayoría de ellos están en edad preescolar, con la finalidad de informarles acerca del proyecto de investigación y solicitarles su colaboración, en tal caso, los datos proporcionados sirvieron para realizar el estudio genético y elaborar los árboles genealógicos correspondientes.

Para conocer si habría diferencia significativa entre la proporción de sexos de casos índice, se aplicó la prueba estadística de χ^2 cuya fórmula fue: $\chi^2 = (O-E)^2 / E$. Donde O = valor observado y E = valor esperado. (Zavala, comunicación personal)

2) Citogenética

En los pacientes se realizó el estudio citogenético mediante cultivo de linfocitos de sangre periférica según la técnica de Yunis (1976) con las modificaciones realizadas en la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana.

- Cultivo de linfocitos

Se obtuvieron 2 ml de sangre periférica de los pacientes y se anticoaguló con 0.2 ml de heparina, posteriormente se sembró en el medio de cultivo que contenía: 4 ml de medio McCoy (Sigma) complementado con 1.25 ml de suero fetal de ternera (Gibco), 0.05 ml de antibiótico (10 IU/ml penicilina y 10 ug/ml estreptomicina), 0.4 ml de glutamina (Gibco) y 0.3 ml de fitohemaglutinina (Microlab). Después de un período de incubación de 48 horas a 37 °C, se agregó Metotrexate ($1 \times 10^{-7} M$) a los cultivos y se dejó actuar 17 horas más, posteriormente se eliminó el bloqueo de Metotrexate con 2 lavados de medio McCoy sin suplementar y se adicionó solución de Timidina ($1 \times 10^{-5} M$) al cultivo, la cual actuó durante 5:30 horas.

- Cosecha

Una vez transcurridas las 72 horas del cultivo, se realizó la cosecha utilizando colchicina (30 ug/ul) como agente inhibidor del huso mitótico, durante 15 minutos y Cloruro de Potasio 0.075 M, como solución hipotónica, durante 20 minutos. El lavado y fijación de las células se realizó con la mezcla de metanol:ácido acético (3:1), hasta obtener una muestra suficiente para realizar las laminillas por goteo en portaobjetos fríos con etanol.

- Bandas G

La maduración de los cromosomas duró de 1 a 3 días, después de los cuales se trataron con solución de tripsina al 0.02% en Buffer de fosfatos (Na_2HPO_4 , 0.025M y KH_2PO_4 , 0.025M) a 37 °C, durante 1-1'45 min, posteriormente se enjuagaron en solución de Cloruro de Sodio al 0.9% y se tiñeron con Giemsa al 2% en Buffer de Fosfatos, de 5-8 min para llevar a cabo la técnica de bandas G de alta resolución (Viegas-Pequignot y Dutrillaux, 1978). Posteriormente se realizaron las observaciones de los cromosomas en un microscopio óptico a 100X, poniendo especial interés en la región q14 del cromosoma 13.

3) Estudio molecular

- Aislamiento del DNA total

En los pacientes y en sus familiares de primer grado se efectuaron estudios de genética molecular mediante extracción de DNA de leucocitos de acuerdo a Kempter, (1992) con las modificaciones que a continuación se mencionan. Se obtuvo la sangre periférica (7 ml) de los individuos utilizando como anticoagulante 30 ul de EDTA (0.5 M, pH=8.5), se recuperaron los leucocitos por centrifugación y se lavaron con una solución de lisis de glóbulos rojos (MgCl₂, 5 mM; NaCl, 10 mM; Trizma-base, 10 mM) para obtener la pastilla de glóbulos blancos. Posteriormente los leucocitos se lisaron con 23 ul de SDS (10%), las proteínas se precipitaron con alta concentración de sal (443 ul de NaCl 5 mM; 154 ul de NaCl saturado) y al sobrenadante se le hicieron extracciones fenólicas. El DNA se precipitó en etanol frío y finalmente se resuspendió en agua estéril. Se valoró la pureza del DNA mediante el espectrofotómetro y la integridad y cuantificación por medio de geles de agarosa.

- Amplificación de DNA por PCR

Se amplificaron por PCR los VNTRs que se ubican dentro del gen de retinoblastoma en el intron 16, de acuerdo con la técnica de Scharf *et al.* (1992), con algunas modificaciones. Para realizar la amplificación de esta región fué necesario estandarizar el método variando parámetros tales como el número de ciclos, la duración de cada uno durante la reacción de PCR, la concentración de la enzima Taq polimerasa y la concentración de MgCl₂, debido a que no estaban reportadas todas las condiciones del ensayo.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en 50 ul de volúmen total que contenía lo siguiente: los oligonucleótidos se utilizaron a una concentración de 25 pmol cada uno, su secuencia fue:

[RBD21(5'-CGTTAATATTTACCTAACGTATGGCCAAGTTTCC-3'), RBD24(5'-GAGCCTCGGTCTCATCACCAAGGGGGTGG - 3')] (Scharf *et al.* 1992), Cloruro de

Magnesio 2.0 mM, 2.5 U de Taq polimerasa (Gibco), amortiguador de la polimerasa 1X, 200 uM de cada dNTP (Pharmacia) y una cantidad de muestra aproximada de DNA de 200 ng/ul.

La amplificación constó de 30 ciclos, con una temperatura previa de desnaturalización de 94 °C durante 5', cada ciclo fue de 1'/94 °C de desnaturalización, 1'/64 °C de alineamiento, 2'/72 °C de extensión y al final de los ciclos se incluyó una extensión final de 5'/72 °C.

- Electroforesis de ácidos nucleicos

Las muestras de DNA obtenidas de leucocitos y los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en geles de agarosa de 0.8 al 1% que contenían 0.5 ug/ml de Bromuro de Etidio. Como buffer de corrida se utilizó el Tris-Borato-EDTA al 0.5 X (Sambrook *et al.* 1990).

El marcador de peso molecular fue la escalera de 123 pb (Gibco, BRL). El tamaño aproximado de los productos amplificados se obtuvo a través de una regresión lineal tomando como referencia el marcador de DNA antes mencionado.

4) Inmunohistoquímica de la proteína pRB

- Obtención de cortes histológicos

Las piezas oculares con retinoblastoma enucleadas, se obtuvieron de pacientes que acudieron al Servicio de Oftalmología del Hospital de Pediatría del CMN S. XXI.

La pieza ocular con retinoblastoma se fijó (de acuerdo a la técnica utilizada en el laboratorio de Patología del Hospital de Pediatría CMN SXXI) en solución de formaldehído al 10% en amortiguador de fosfatos (NaHPO₄, 0.4% y Na₂PO₄, 0.65%), posteriormente se deshidrataron las muestras en etanol de 30%, 50%, 70%, 90%, 95%, 100% y se transparentaron con xilol para posteriormente incluirlas en parafina. Se realizaron cortes histológicos seriados con un grosor de 3-5 micras en un microtomo y se montaron en portaobjetos tratados con poli-D-Lisina.

- Inmunohistoquímica de la pRB en retinoblastomas

Para asegurar la integridad del tejido, uno de los cortes de la serie se tiñó con Hematoxilina-Eosina (H-E). El análisis inmunohistoquímico se realizó como se describe a continuación:

Se quitó el exceso de parafina a los cortes en una estufa a 60 °C, enseguida se hidrataron desde xilol hasta solución de fosfatos PBS, posteriormente se trataron con peróxido de hidrógeno al 0.3% en metanol y se bloqueó con albúmina al 10%. Posteriormente se adicionó el primer anticuerpo policlonal Rb C-15 [1:100] (Santa Cruz, Biotechnology), de conejo, dirigido contra 15 aminoácidos que se sitúan en el dominio carboxilo-terminal de la proteína pRB y detecta tanto la forma hipofosforilada como la hiperfosforilada, este anticuerpo se dejó incubando toda la noche.

Como sistema de detección se usó el sistema DAKO Monoclonal Kit System-PAP (Dako Corporation) que consistió en adicionar un segundo anticuerpo de unión dirigido contra Inmunoglobulinas de conejo y finalmente el complejo peroxidasa-antiperoxidasa. Posteriormente la reacción se desarrolló con Peróxido de Hidrógeno y Diaminobenzidina y se monitoreó al microscopio. La contratinción se hizo con Hematoxilina de Harris.

- Observación de los cortes

Los cortes de retinoblastoma se observaron a 10X, para ubicar la distribución del tumor en el corte ocular, una vez determinado el tumor se incrementó el aumento a 16X y 40X para observar con más detalle las células. Para las observaciones se consideraron los parámetros de diferenciación que consistieron en caracterizar al tumor como indiferenciado, si no presentaba células tumorales en arreglos particulares; diferenciado, si presentaba arreglos celulares del tipo de rosetas o con retina, si tenía porciones de ésta morfológicamente normal. También se tomaron en cuenta los patrones de tinción de la pRB para lo cual se usó una escala cualitativa: - ausencia de tinción para pRB; + tinción débil; ++ tinción mediana; +++ tinción fuerte.

VI. RESULTADOS

1) Estudio genético

En el presente estudio se analizaron 12 familias con retinoblastoma (tabla 1, fig. 9), de las cuales, 8 no presentaron antecedentes familiares y 4 sí. A todas se les realizó un estudio genético elaborando su árbol genealógico.

De acuerdo a la forma de retinoblastoma del caso índice, 4 de las familias estudiadas presentaron caso índice con retinoblastoma esporádico unilateral, 3 de los casos fueron mujeres y un varón; 4 familias presentaron retinoblastoma esporádico bilateral, en este caso todos los individuos afectados fueron varones; 1 familia presentó caso índice con retinoblastoma unilateral heredado; y finalmente, 3 familias presentaron caso índice con retinoblastoma bilateral heredado, en 2 de ellas el caso índice fué varon y en una familia fué mujer.

En la tabla 1 se resumen las características en general de cada familia estudiada y el tipo de análisis que se realizó principalmente en el caso índice. En la figura 9 se muestran los árboles genealógicos.

- Casos unilaterales esporádicos

De acuerdo a la figura 9 que presenta el árbol genealógico de las familias y a la tabla 1 que presenta los datos adicionales del caso índice respecto a la enfermedad, se observa que el caso índice de la familia Rb-1 (II-2) es la segunda hija de un matrimonio de padres aparentemente sanos y padeció retinoblastoma unilateral derecho; el caso índice de la familia Rb-2 (II-1) es también una niña, la primera del matrimonio, con retinoblastoma unilateral izquierdo. En la familia Rb-3 hubo una niña (II-2), la segunda después de un aborto, con retinoblastoma unilateral derecho. Los tres individuos anteriores tuvieron una edad de diagnóstico del retinoblastoma antes de los 2.5 años; en el caso de la familia 4, el caso índice (II-2) es un varón que presentó retinoblastoma unilateral en ojo derecho, es el segundo hijo del matrimonio y aquí resalta el hecho de que la edad de diagnóstico del retinoblastoma fué hasta los 9 años.

- Casos bilaterales esporádicos

A continuación, de acuerdo a la tabla 1 y figura 9, se observa que el caso índice de la familia Rb-5 (II-5) es un varón, el quinto hijo y presentó retinoblastoma bilateral a una edad

de 2 años 5 meses. En la familia Rb-6, es caso índice (II-1) es un varón, hijo único y la edad de diagnóstico del retinoblastoma bilateral esporádico fué de 9 meses. En la familia Rb-7, el caso índice (II-1) también es un varón, hijo único y la edad en que se le diagnosticó retinoblastoma fué de 3 meses. Por último, en la familia Rb-8, el hijo único, varón (II-1) se le detectó retinoblastoma bilateral esporádico a la edad de 4 meses.

- Casos unilaterales heredados

En la misma tabla y figura anteriores, podemos observar que solamente una familia, Rb-9, presentó caso índice (IV-3) con retinoblastoma unilateral heredado, en esta, 3 hermanos del individuo (IV-2, IV-4 y IV-6) también padecieron retinoblastoma unilateral, las edades de diagnóstico fluctúan entre 3 y 4 años. Además existen los siguientes antecedentes, aunque no fueron estudiados en este trabajo: por vía paterna hubo 2 hermanos (III-2, III-9) y dos primos (III-1, III-14) que fallecieron de retinoblastoma, adicionalmente se observa que los individuos II-1 y II-2 que comparten el mismo padre, padecieron retinoblastoma y están emparentados por vía paterna respecto al caso índice.

- Casos bilaterales heredados

Por último se puede observar, en la tabla 1 y figura 9 que hubo 3 familias que presentaron casos índice con retinoblastoma bilateral heredado. En la familia Rb-10, el caso índice (II-1) es un varón, hijo único que tenía 3 años 6 meses a la edad de diagnóstico y con el antecedente de que su madre (I-2) también presentó retinoblastoma en la infancia.

En la familia Rb-11, el caso índice (III-4) es una mujer, la cuarta del matrimonio, se le diagnosticó retinoblastoma a los 2 años 6 meses de edad, como antecedentes, está un medio-hermano (III-5) por vía paterna al cual se le diagnosticó retinoblastoma bilateral en la infancia, además hay antecedentes de que dos hermanos del padre (II-4, II-7) del caso índice padecieron retinoblastoma unilateral.

Finalmente en la familia Rb-12, el caso índice (III-16) es un varón, padece retinoblastoma bilateral, la edad de diagnóstico de la neoplasia fué a los 2 años; como antecedentes, dos de sus hermanas (III-13, III-15), presentaron retinoblastoma bilateral y en generaciones anteriores, hubo 3 hermanos del padre (II-1, II-2, II-19) que padecieron retinoblastoma y varios sobrinos del mismo (III-3, III-5, III-11, IV-1, IV-4) con problemas de estrabismo. En esta familia únicamente se realizó el estudio genético.

Tabla 1. Datos generales del caso índice

En esta tabla se muestran datos del caso índice y de sus familiares de primer grado vivos respecto a información con el retinoblastoma y los estudios realizados en este trabajo.

CASOS UNILATERALES ESPORADICOS

^a Familia	^b Individuo	^c Parentesco	^d Edad Dx	^e Sexo	^f Forma Rb	^g Antecedentes	^h Cariotipo	ⁱ Análisis VNTR	^j Inmuno-histoquímica
Rb-1	II-2	C.Índice	6/12	Fem	Uni	no	46, XX	no	no
Rb-2	II-1	C.Índice	2, 4/12	Fem	Uni	no	46, XX	no	si
Rb-3	II-2	C.Índice	1, 6/12	Fem	Uni	no	46, XX	no	no
Rb-4	II-2	C.Índice	9	Masc	Uni	no	46, XY	no	si

continúa...

CASOS BILATERALES ESPORADICOS

Rb-5	II-5	C.Indice	2, 5/12	Masc	Bil	no	46, XY	no	si
Rb-6	II-1	C.Indice	9/12	Masc	Bil	no	47,XXY	no	si
Rb-7	II-1	C.Indice	3/12	Masc	Bil	no	46,XY	no	no
Rb-8	II-1	C.Indice	4/12	Masc	Bil	no	46, XY	no	si

CASOS UNILATERALES HEREDADOS

Rb-9	IV-3	C.Indice	4	Masc	Uni	si	46, XY	si	no
	IV-4	Hermano	4	Masc	Uni	si	46, XY	si	no
	IV-6	Hermano	3	Masc	Uni	si	46, XY	si	no

	III-3	Padre	no Rb	Masc	----	----	46, XY	si	----
	III-4	Madre	no Rb	Fem	----	----	46, XX	si	----

CASOS BILATERALES HEREDADOS

Rb-10	II-1	C.Indice	3, 6/12	Masc	Bil	si	no	si	no
	I-2	Madre	infancia	Fem	Bil	no	46, XX	si	no
Rb-11	III-4	C.Indice	2, 6/12	Fem	Bil	si	no	si	no
	III-5	Hermano	infancia	Masc	Bil	si	no	si	no
Rb-12	III-16	C.Indice	2	Masc	Bil	si	no	no	no

Descripción de las columnas:

a) Familia, se refiere a la clave que se ha dado a la familia estudiada y corresponde a los árboles genealógicos mostrados en la figura 9.

b) Individuo, hace referencia a la ubicación del mismo en la figura 9.

- c) Parentesco, se refiere al individuo que se esta estudiando en una familia determinada.
 - d) Edad Dx, es la edad en que se diagnosticó el retinoblastoma en el individuo, se da en años y/o en meses. Infancia se refiere a una edad de diagnóstico no exacta.
 - e) Sexo: Fem, femenino; Masc, masculino.
 - f) Forma Rb, se refiere a como se manifestó el retinoblastoma: Uni, unilateral; Bil, bilateral.
 - g) Antecedentes, se refiere a si existen otros individuos en la familia que padecieron retinoblastoma.
 - h) Cariotipo, es el resultado de la observación del complemento cromosómico.
 - i) Análisis VNTR, se refiere a si o no se realizó este tipo de análisis en la familia.
 - j) Inmunohistoquímica, se refiere a si o no se realizó la detección de la proteína pRb en los retinoblastomas correspondientes al individuo.
- Las casillas con ---- de los individuos Rb-9, III-3 y III-4 indican que debido a que ellos no padecen retinoblastoma, no se puede obtener información respecto a estos aspectos.

Figura 9. Arboles genealógicos de las familias estudiadas

Caso índice →

Forma de retinoblastoma: Unilateral



Bilateral



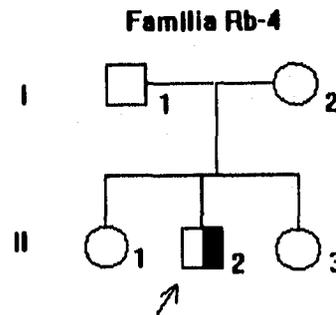
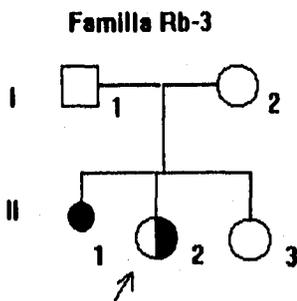
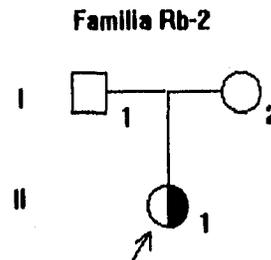
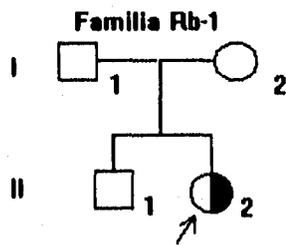
Individuos que fallecieron por causa diferente a retinoblastoma

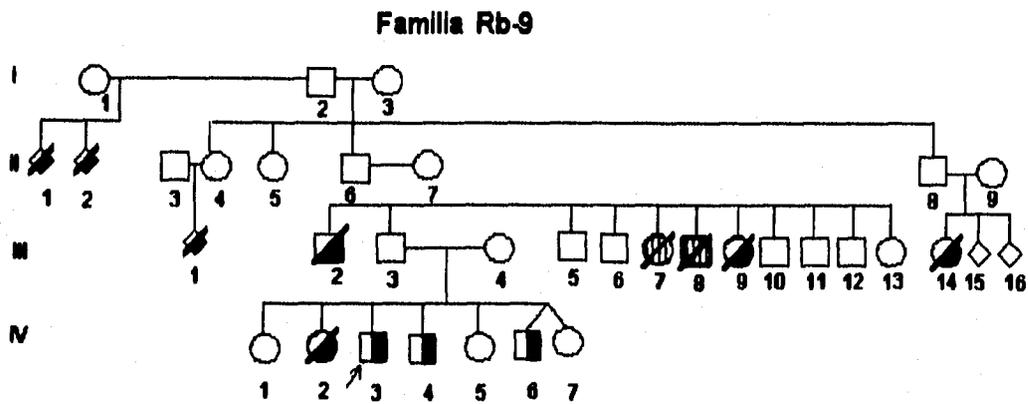
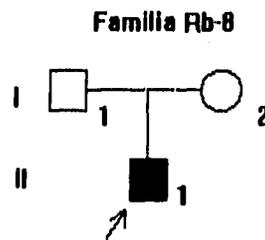
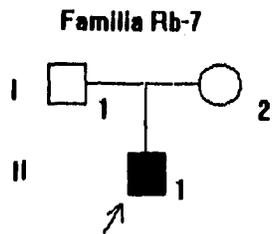
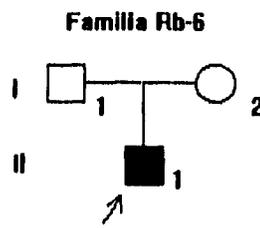
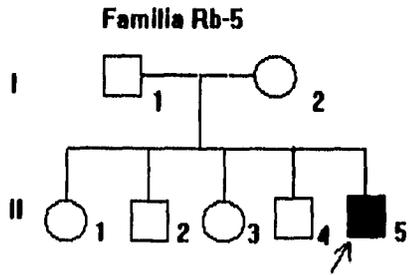


Padecen estrabismo

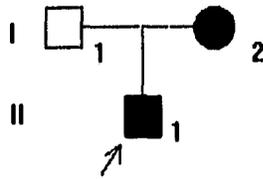


Padecen Retinoblastoma no se sabe si Uni o Bil

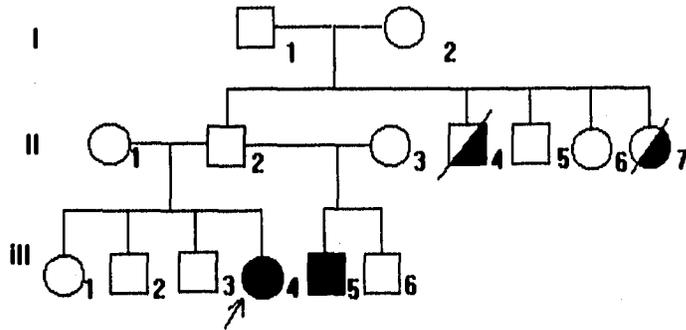




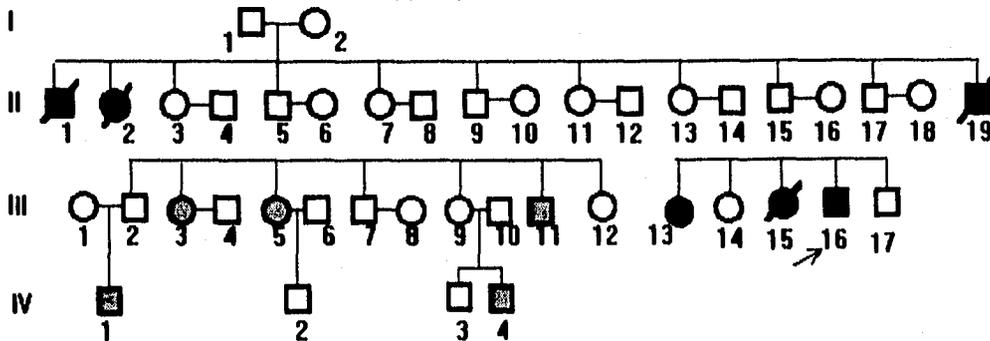
Familia Rb-10



Familia Rb-11



Familia Rb-12



2) Estudio citogenético

Observación de metafases

En los casos de retinoblastoma esporádico el estudio citogenético se llevó a cabo en los casos índice y sólo cuando se encontró alguna alteración cromosómica se realizó también en los familiares de primer grado. En retinoblastomas familiares, el estudio se realizó, cuando fue posible en todos los individuos afectados y familiares de primer grado, como se reporta en la tabla 1. En total, se observaron 9 casos índice y 5 familiares de primer grado.

Se eligieron un promedio de 20 metafases de cada individuo cuyos cromosomas iban de mediana a alta resolución, para conocer el complemento cromosómico y se observó con mayor énfasis la banda 13q14, región donde se localiza en gen RB.

De las 12 familias estudiadas, tanto casos índice y familiares de los mismos, ninguno presentó pérdida de la banda 13q14 observable al microscopio óptico, aunque regularmente se observó un acortamiento de la misma impidiendo ver la región 13q14.2 en uno de los cromosomas.

En la figura 10 se muestra un cariotipo de un paciente con retinoblastoma (Familia Rb-3, individuo II-2) donde se observan los cromosomas 13 normales, como un ejemplo de los cariotipos que se observaron en este trabajo.

Solamente el caso índice de la familia Rb-6 (tabla 1, fig. 9) presentó un complemento cromosómico anormal y un polimorfismo en el cromosoma 1, (fig. 11), su complemento cromosómico fue 47, XXY, var (1)(q12 GTG 44), var (1)(q12 GTG 14).

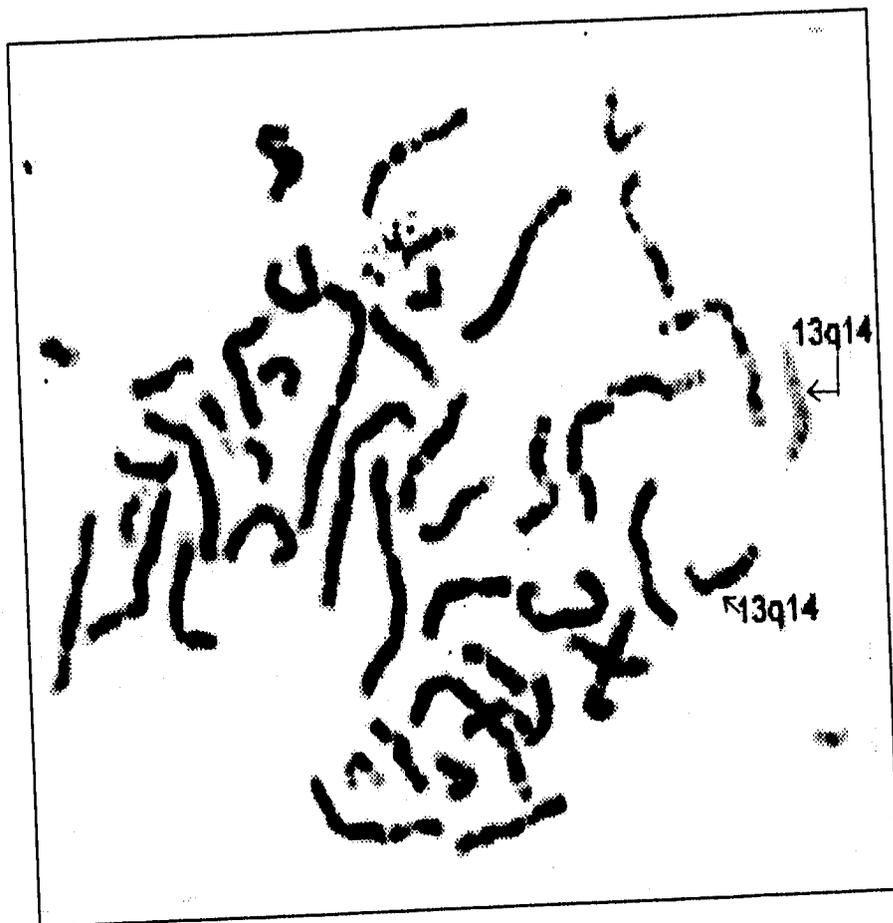


Fig. 10. Metafase que representa el complemento cromosómico del caso índice de la familia Rb-3 el cual fué: 46, XX. Ejemplo de las metafases obtenidas en la mayoría de los individuos estudiados. La obtención del cariotipo se realizó de acuerdo a lo descrito en material y métodos.

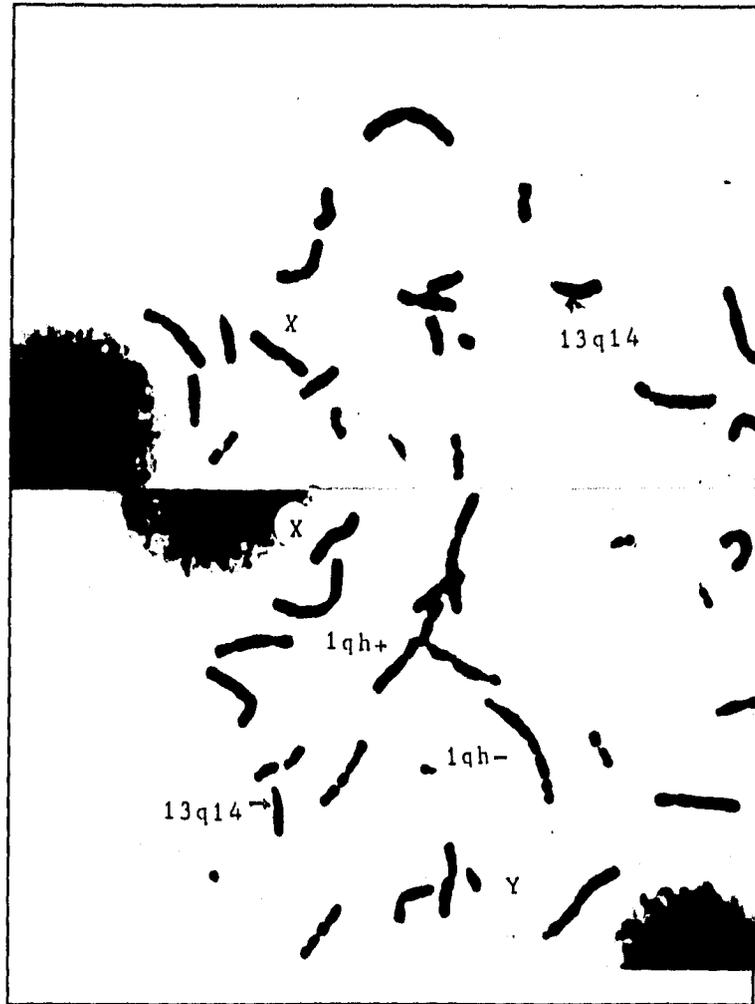


Fig. 11. Metafase que representa el complemento cromosómico del caso índice de la familia Rb-6 el cual se reporta como: 47, XXY, var (1)(q12 GTG 44), var (1)(q12 GTG 14). Se observan los cromosomas 13 normales al microscopio óptico, los cromosomas 1 polimórficos y los cromosomas sexuales. La obtención del cariotipo se realizó de acuerdo a lo descrito en material y métodos.

3) Estudio molecular.

Análisis de ligamiento en retinoblastomas familiares

En aquellas familias que tenían antecedentes de la enfermedad (retinoblastoma heredado) se llevó a cabo el estudio de ligamiento empleando una secuencia polimórfica tipo VNTR localizada en el intron 16. Las familias estudiadas en este caso fueron la Rb-9, Rb-10 y Rb-11.

En la figura 12 se muestran los resultados de la amplificación del VNTR del intron 16 del gen de retinoblastoma obtenidos para la familia Rb-9 en los individuos de las generaciones III-3, III-4 y en la generación IV (Fig. 9 familia Rb-9). En este caso todos los individuos de la familia tanto sanos como enfermos fueron homocigotos para el alelo amplificado por lo cual el marcador resultó ser no informativo para la familia. El alelo correspondió a un peso de aproximadamente 1230 pares de bases.

En la figura 13, se puede observar la segregación mendeliana de los alelos en la familia Rb-10. Para ese caso, los tres individuos resultaron heterocigotos para la región del VNTR-intron 16; el padre tiene los alelos que corresponden a 1369/976 pb, la madre presenta los que corresponden a 1369/1256 pb, el caso índice heredó el de 976 del padre y el de 1256 de la madre y debido a que ella presentó retinoblastoma en su infancia, se sugiere que es el que está segregando con la enfermedad, por lo tanto en esta familia el polimorfismo resultó ser informativo.

En la figura 14, para la familia Rb-11, sólo se muestra parte del árbol genealógico y que corresponde a los individuos II-1, II-2, II-3, III-4 y III-5 (fig. 9) Aquí se puede ver que los individuos II-1 y III-5 fueron homocigotos para el VNTR-intron 16 y presentaron las bandas que corresponden a 1436 pb y 1311 pb respectivamente. Los individuos II-2 y III-4 son heterocigotos, presentan ambas las bandas de 1436/1311 pb. No fue posible conseguir muestra sanguínea del individuo II-3, sin embargo, se deduce, de acuerdo con los datos del árbol genealógico y la segregación de alelos, que el alelo paterno que corresponde a 1311 pb es el que está segregando con la enfermedad ya que es compartido por el caso índice y su medio hermano, ambos con padecimiento de retinoblastoma. En esta familia también resultó ser informativo el polimorfismo para el estudio de ligamiento.

Familia Rb-9

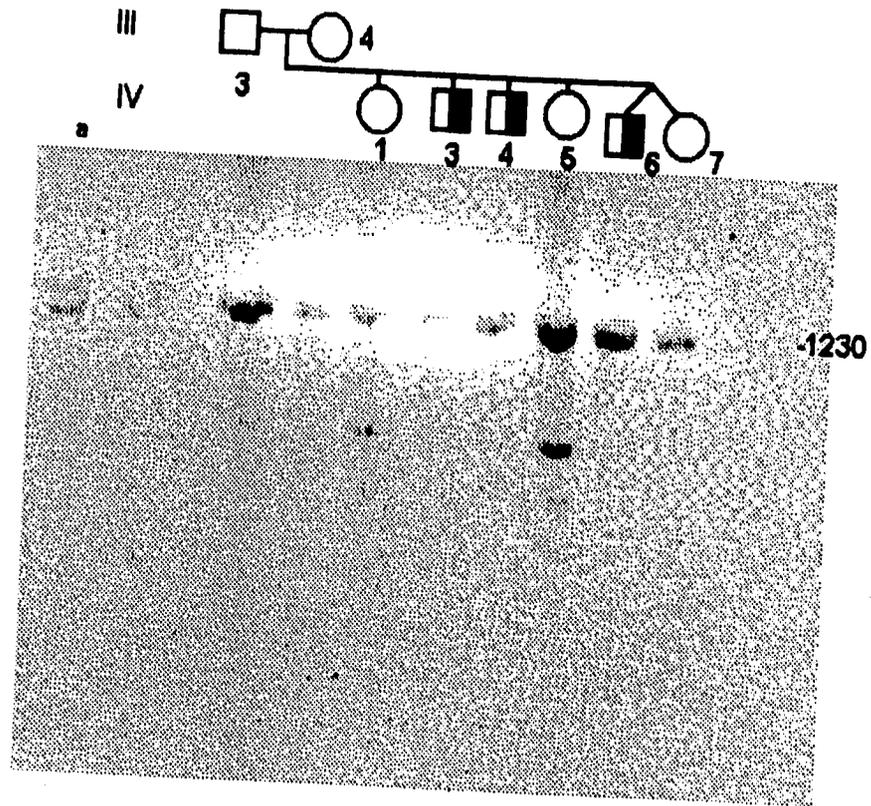


Fig. 12. Análisis de ligamiento con el VNTR-16 en la familia Rb-9. El DNA genómico fue aislado de leucocitos y amplificado como se describe en material y métodos. Una alícuota de cada muestra se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 1% y se tiñó con Bromuro de Etidio. La flecha indica el alelo de aproximadamente 1230 pb presente en esta familia para el cual todos los individuos fueron homocigotos. a) Alelos (1256/1369) de un individuo control heterocigoto para la región amplificada. En el árbol no se esquematiza el individuo IV-2 por fallecimiento. Algunos carriles presentan bandas inespecíficas además de la de 1230 pb como en V-5.

■ Individuos con retinoblastoma unilateral.

Familia Rb-10

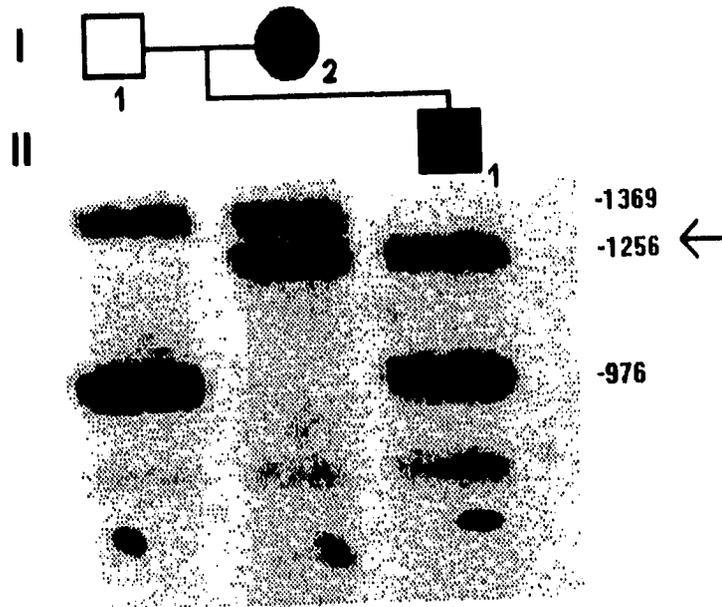


Fig. 13. Análisis de ligamiento con el VNTR-16 en la familia Rb -10. El DNA genómico fue aislado de leucocitos y amplificado como se describe en material y métodos. Una alícuota de cada muestra se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 1% y se tiñó con Bromuro de Etidio. La flecha señala el alelo de aproximadamente 1256 pb que segrega junto con la enfermedad y el cual comparten madre e hijo, ambos con el padecimiento. Los tamaños de los alelos indicados a la derecha de la figura fueron determinados por el marcador de escalera 123, dato no mostrado.

■ ● Individuos que padecen retinoblastoma bilateral.

Familia Rb-11

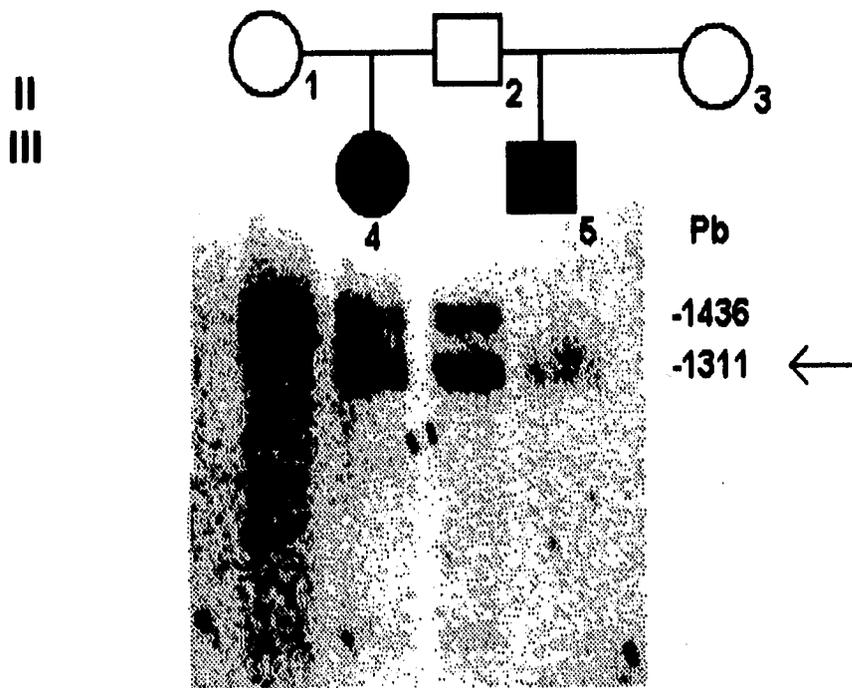


Fig. 14. Análisis de ligamiento con el VNTR-16 en la familia Rb-11. El DNA genómico fue aislado de leucocitos y amplificado como se describe en material y métodos. Una alícuota de cada muestra se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 1% y se tiñó con Bromuro de Etidio. El alelo paterno de 1311 pb indicado por la flecha es el que segrega con la enfermedad debido a que los individuos afectados III-4 y III-5 de diferente madre, comparten este. Esta banda de 1311 pb indica que el padre es portador del alelo que predispone a retinoblastoma. Los tamaños de los alelos indicados a la derecha de la figura fueron determinados por el marcador de escalera 123, dato no mostrado. ■ ● Individuos que padecen retinoblastoma bilateral.

4) Inmunohistoquímica

Detección de la pRB en retinoblastomas

La inmunodetección de la proteína pRB se efectuó en cortes histológicos de 7 retinoblastomas esporádicos. De ellos, 2 provinieron de individuos afectados unilateralmente y 4 de individuos con retinoblastoma bilateral, de este tipo se estudiaron 2 muestras del mismo individuo que se enuclearon a diferente tiempo (Tabla 2). De los tumores estudiados, 6 provenían de pacientes masculinos y 1 de paciente femenino. Como control se utilizó una retina sin retinoblastoma de un individuo masculino de 4 años de edad.

Patrón de tinción de la retina normal.

En lo que se refiere a la histología del tejido normal, que sirvió como control y provino del ojo de un niño sano, se observó por tinción de Hematoxilina-Eosina (fig. 15) la integridad del corte donde se localizan 6 capas de la retina. Las capas que se señalan con las letras A, C, E se tiñeron preferentemente con Eosina debido a que no contienen núcleos; las capas representadas con letras B, D, F son capas nucleadas que se tiñeron preferentemente con Hematoxilina.

La figura 16 muestra una retina de ojo normal en la cual se realizó la inmunohistoquímica para la proteína pRB. Los segmentos externos o fotosensibles de los conos y bastones corresponden a la letra A, esta capa no presenta núcleos, por lo cual no mostró tinción para la proteína pRB. La capa nuclear externa (B) presentó tinción heterogénea de los núcleos (Tabla 2) los cuales se tiñeron en su mayoría fuertemente con Hematoxilina por lo tanto fueron negativos para la detección de la proteína pRB (-), sin embargo se observó que algunos núcleos, presentaron tinción positiva y mediana (++) para la proteína. La capa plexiforme externa (C) no presenta núcleos. En la nuclear interna (D) se observaron núcleos con tinción negativa (-) para la proteína pRB y la mayoría de ellos fueron positivos para la misma yendo de tinción mediana (++) a fuerte (+++). La capa plexiforme interna (E) es anucleada. En la capa de células ganglionares (F) existen pocos núcleos que en su mayoría mostraron tinción débil (+) para la proteína pRB y algunos, los menos, mostraron tinción negativa (-).

En la figura 17 se puede observar una retina normal que corresponde al control negativo de la inmunohistoquímica de la figura 16. Las capas nucleadas B, D, F muestran la tinción del colorante de contraste que es la Hematoxilina.

Patrón de tinción en Retinoblastomas.

Las figuras 18, 19, 20, 21, representan ejemplos de retinoblastomas con diferentes grados de diferenciación y tinción .

Con respecto a los siete tejidos tumorales estudiados, se observaron distintos grados de diferenciación, como fueron tumor diferenciado en rosetas de Flexner Wintersteiner (figs. 18 y 19), masa tumoral indiferenciada (fig. 20) y la estructura normal de la retina junto con zonas tumorales (fig. 21). Además en algunos retinoblastomas se pudieron observar las tres morfologías mencionadas (tabla 2).

En este trabajo, el retinoblastoma que mostró diferenciación en rosetas fué el RBT-5 que además fué el único negativo para la detección inmunohistoquímica de pRB (tabla 2, fig. 19). Ningún tumor mostró zonas de rosetas y retina.

Los retinoblastomas que mostraron únicamente tumor indiferenciado fueron el RBT-4, y el RBT-7 (tabla 2, fig. 20). En los que se observó tumor indiferenciado y retina fueron RBT-2, y RBT-8; y en los que se observó tanto tumor indiferenciado, rosetas positivas para pRB (fig. 18) y retina (fig. 21) fueron RBT-6 y RBT-7a.

La figura 18 representa un ejemplo de tumor diferenciado en rosetas de Flexner-Wintersteiner retinoblastomas RBT-6 y RBT-7a (tabla 2). Los núcleos presentaron en su mayoría tinción positiva para la proteína pRB, cuya intensidad fue de débil (+) a mediana (++). Se observaron muy pocos núcleos negativos (-) y la infiltración de tejido linfóide (l) hacia el tumor. Además se apreciaron vasos capilares con eritrocitos en su interior (e).

En la figura 19 se muestra el tumor RBT-5 (tabla 2) diferenciado en rosetas de Flexner-Wintersteiner cuyos núcleos, en su totalidad, fueron negativos (-) para la proteína pRB. También se observó infiltración de tejido linfóide (l).

La figura 20 muestra el ejemplo de un retinoblastoma no diferenciado, la masa tumoral no muestra ningún arreglo específico. Los núcleos de las células tumorales fueron desde negativos (-) pasando por toda la gama de intensidades para la proteína pRB: débil (+), mediana (++), fuerte (+++), fueron frecuentes en este tipo de tumores figuras mitóticas como metafases (m) y anafases (a) en este caso, la localización de la proteína fué en el citoplasma. También hubo núcleos cuyas características sugieren que la célula se ha ido a apoptosis (p), se observó además tejido linfóide infiltrado (l)

Finalmente, se observaron también porciones de retina bien conservada, el patrón de tinción de las capas fue muy heterogéneo en los diferentes tumores (Tabla 2). En la figura 21 se observa una retina de un retinoblastoma en donde se vió el crecimiento de la masa tumoral y la retina ha perdido parte de su estructura. Se pueden apreciar la capa ganglionar (F)

aparentemente conservada morfológicamente, la capa plexiforme interna (E) en las mismas condiciones; se puede notar que la capa nuclear interna (D) se deforma y se confunde con el resto de las capas. La masa tumoral (T) parece iniciarse en la capa nuclear externa ya que de ella parecen derivar las células que han perdido el arreglo de dicha capa. Se observa además el epitelio pigmentado de la retina (EP) que corresponde a una de las capas que la conforman.

Tabla 2. Observaciones de la tinción de la pRB en retinoblastomas.

^a Tumor	^b Forma Rb	^c Edad enucleación	^d Sexo	^e Diferenciación	^f Patrón de tinción
Control	-----	4	Masc	RETINA	
				Ganglionar	+, -
				N. Interna	-, ++, +++
				N. Externa	-, ++
RBT-2	Uni	2, 4/12	Fem	RETINA	
				Ganglionar	+
				N. Interna	++, +++
				N. Externa	-, ++
				T. Indiferenciado	++, +
RBT-4	Uni	9	Masc	T. Indiferenciado	+, -
RBT-5	Bil	2, 5/12	Masc	T. Diferenciado	-

continúa...

RBT-6	Bil	1	Masc	RETINA	
				Ganglionar	+
				N. Interna	++, -
				N. Externa	++, -
				T. Indiferenciado	++, -
				T. Diferenciado	++, -
RBT-7	Bil	4/12	Masc	T. Indiferenciado	+, ++
RBT-7a	Bil	5/12	Masc	RETINA	
				Ganglionar	++
				N. Interna	++
				N. Externa	+
				T. Indiferenciado	++
				T. Diferenciado	+, -
RBT-8	Bil	7/12	Masc	RETINA	
				Ganglionar	+
				N. Interna	+, -
				N. Externa	-, +
				T. Indiferenciado	-, +

Descripción de columnas:

- a) Tumor es la clave que corresponde al ejemplar que se obtuvo del caso índice correspondiente: Tumor RBT-2 corresponde al ejemplar del caso índice de la familia Rb-2 etc.
- b) Forma Rb, se refiere a como se manifestó el retinoblastoma. Uni: unilateral; Bil: bilateral.
- c) Edad de enucleación, esta dada en años y/o meses.
- d) Sexo Masc: masculino; Fem: femenino.
- e) Diferenciación indica la estructura del tejido que se observó en el tumor.
- f) Patrón de tinción se refiere a la intensidad de la misma para la proteína pRb en las células: - no hubo tinción de la proteína; + tinción débil; ++ tinción mediana; +++ tinción fuerte. Cuando los símbolos están separados por comas quiere decir que la capa tuvo diferentes grados de tinción, el orden de los símbolos presenta decrecientemente la predominancia de la misma.

Fig. 15. Corte histológico de una retina normal teñida con Hematoxilina-Eosina. La técnica se realizó de acuerdo a lo descrito en material y métodos. A) Segmentos externos o fotosensibles, conos y bastones. B) Capa nuclear externa. C) Capa plexiforme externa. D) Capa nuclear interna. E) Capa plexiforme interna. F) Capa de células ganglionares. Vaso sanguíneo (e). Aumento 16 X.

Fig. 16. Inmunohistoquímica de una retina normal. La técnica se realizó de acuerdo a lo descrito en material y métodos. A) Segmentos externos o fotosensibles, conos y bastones. B) Capa nuclear externa. C) Capa plexiforme externa. D) Capa nuclear interna E) Capa plexiforme interna. F) Capa de células ganglionares. Núcleos positivos para pRB con diferente grado de tinción, débil (+), mediana (++), fuerte (+++) núcleo negativo para pRB (-). Aumento 16 X.

Fig. 17. Inmunohistoquímica de una retina normal sin el anticuerpo para pRB (control negativo). La técnica se realizó de acuerdo a lo descrito en material y métodos. A) Segmentos externos o fotosensibles, conos y bastones. B) Capa nuclear externa. C) Capa plexiforme externa. D) Capa nuclear interna E) Capa plexiforme interna. F) Capa de células ganglionares. Aumento 16X.

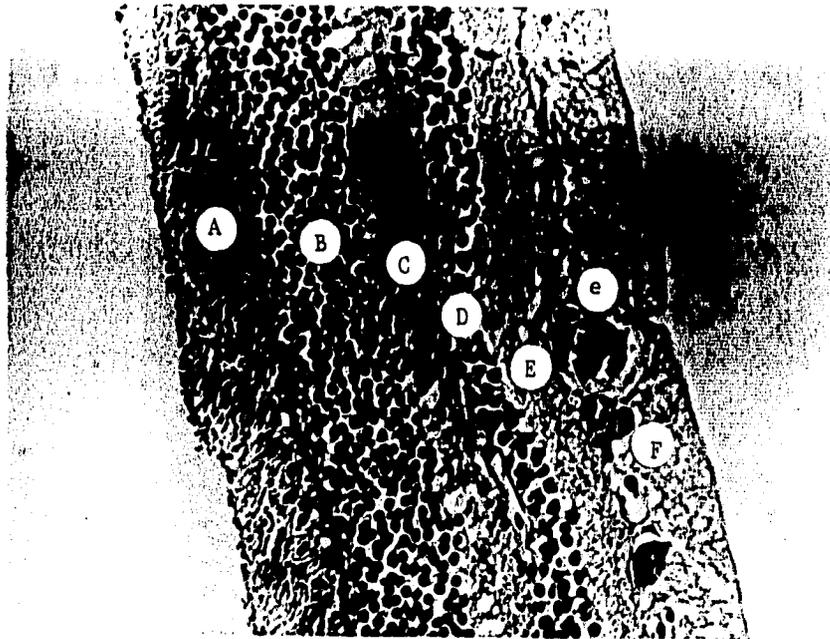


Fig. 15

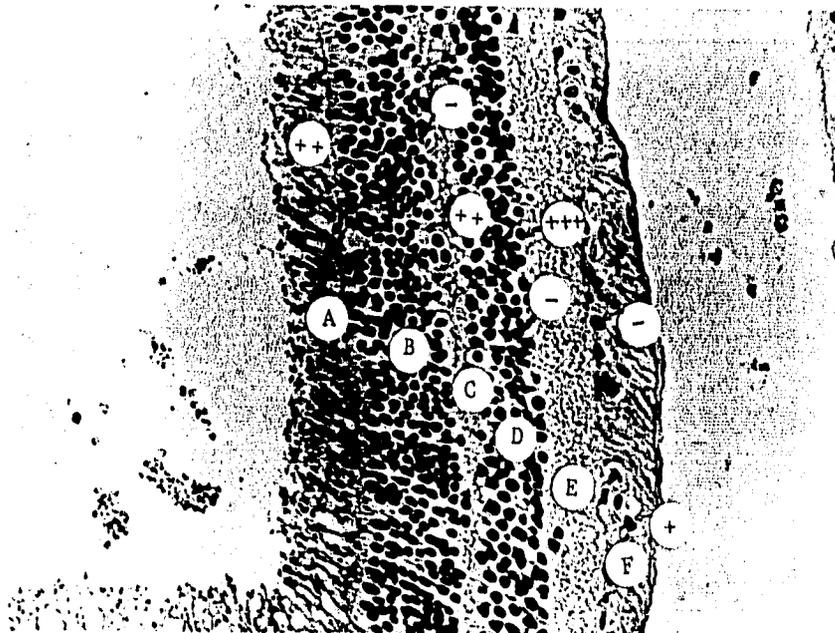


Fig. 16

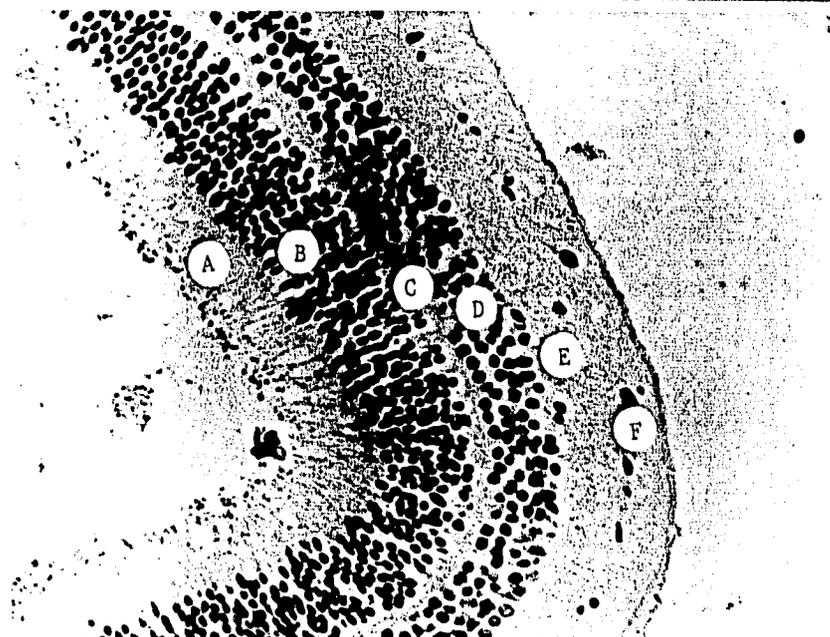


Fig. 17

Fig. 18. Inmunohistoquímica de un retinoblastoma diferenciado. Es un tumor predominantemente positivo para la inmunohistoquímica. La técnica se realizó de acuerdo a lo descrito en material y métodos. Se muestra la disposición del tumor en rosetas (O) y diferentes intensidades de los núcleos para la pRB: Intensidad débil (+) y mediana (++). Se notan algunos núcleos negativos para la pRB (-). Se observan diferentes tipos de leucocitos (l) infiltrados en el tumor. Vaso sanguíneo (e). Aumento 16X.

Fig. 19. Inmunohistoquímica de un retinoblastoma. Es un tumor negativo para la pRB. La técnica se realizó de acuerdo a lo descrito en material y métodos. Tumor con diferenciación de rosetas (O) con patrón de tinción negativo para la pRB(-). Leucocitos (l). Aumento 16 X.

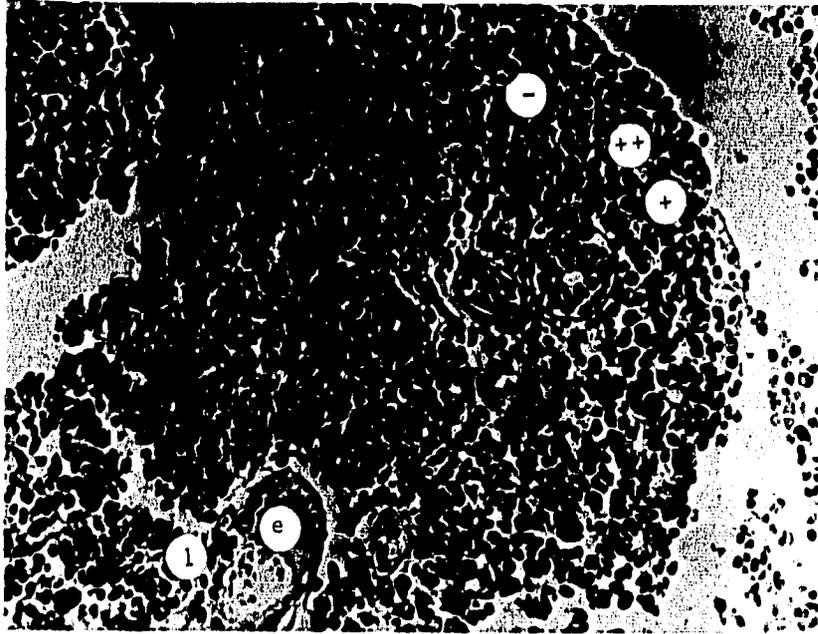


Fig. 18

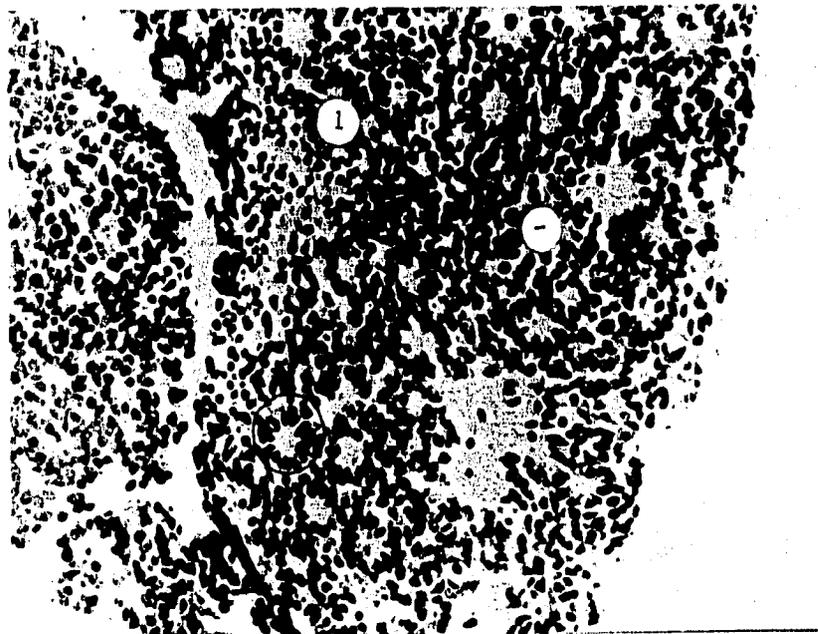


Fig. 19

Fig. 20. Inmunohistoquímica de un retinoblastoma no diferenciado, positivo para la pRB con diferente grado de tinción. La técnica se realizó de acuerdo a lo descrito en material y métodos. Núcleos negativos (-), tinción débil (+), mediana (++), fuerte (+++). Existen células en diferentes estadios del ciclo celular: metafase (m), anafase (a) y que son positivas en su citoplasma para la pRB. Núcleos con morfología que sugiere apoptosis (p). Aumento 40 X.

Fig. 21. Inmunohistoquímica de un retinoblastoma donde se observa parte de la retina conservada. La técnica se realizó de acuerdo a lo descrito en material y métodos. Se reconoce la capa nuclear interna (D), la capa plexiforme interna (E) y la capa de células ganglionares (F). Inicio de la formación de una masa tumoral (T). Epitelio pigmentado (EP). Núcleos negativos para la pRB(-), tinción débil (+). Aumento 16X.

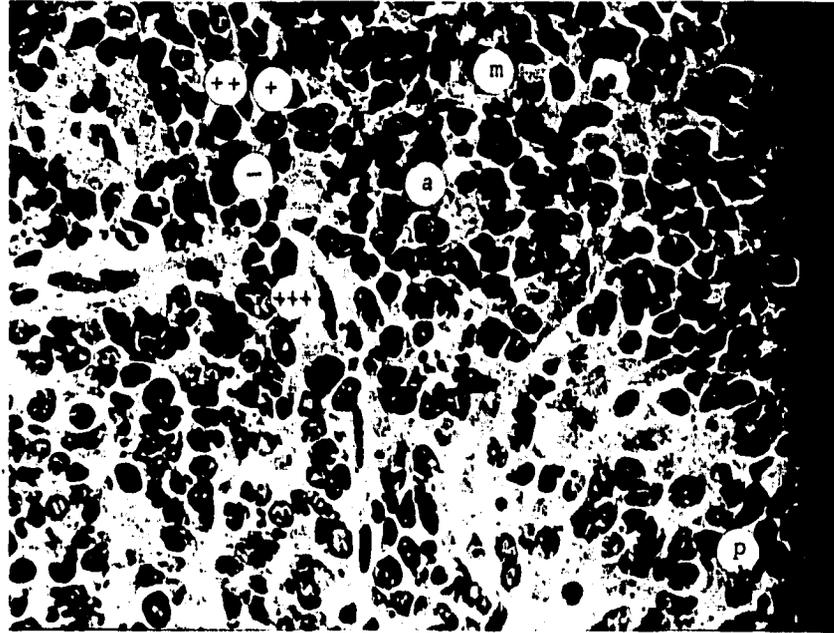


Fig. 20

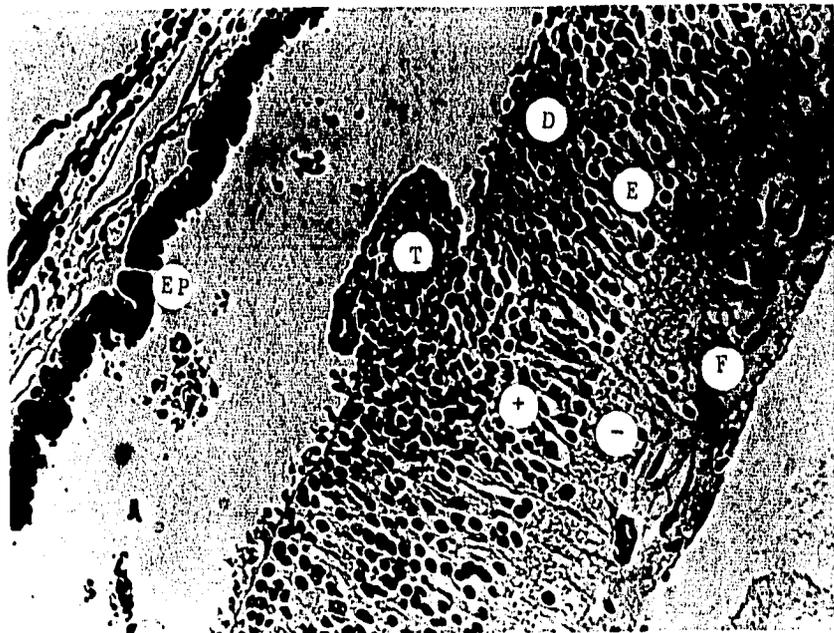


Fig. 21

VII. DISCUSION DE RESULTADOS

1) Estudio genético. Árboles genealógicos.

En el presente trabajo, se realizó un estudio genético del retinoblastoma por medio de la elaboración de árboles genealógicos en 12 familias que presentaron al menos un caso índice con retinoblastoma. De estas familias, 5 presentaron casos índice con retinoblastoma unilateral y las otras 7 con retinoblastoma bilateral; 8 familias fueron casos esporádicos y 4 tenían antecedentes de la neoplasia en la familia. Hubo 4 casos unilaterales esporádicos, 4 casos bilaterales esporádicos, 1 caso familiar de retinoblastoma unilateral y 3 casos familiares de retinoblastoma bilateral.

- Casos unilaterales esporádicos

En la tabla 1 y fig. 9 se observa que las familias Rb-1, Rb-2, Rb-3 y Rb-4 presentaron un caso índice que padeció retinoblastoma unilateral, el cariotipo en todos los casos fué normal y al no existir antecedentes familiares, se trata de retinoblastomas esporádicos unilaterales y se considera que estos pacientes presentaron desarrollo de retinoblastoma por tres causas principales: a) debido a una mutación *de novo* en células somáticas, en cuyo caso no hay peligro de transmisión a sus descendientes (Sorsby, 1972); b) debido a una mutación esporádica de origen embriogénico en las primeras etapas del desarrollo del afectado, en este caso habría peligro de transmisión a sus descendientes dependiendo de si fueron afectadas también las células gonadales (Carlson *et al.* 1979) y c) se pudiera tratar de retinoblastomas originados por una mutación *de novo* que se dió en alguno de los gametos de los progenitores y al igual que en el caso anterior, la mutación sería de tipo constitucional y habría posibilidad de transmitirla a los descendientes del afectado, este último evento corresponde al 15% de los individuos que presentan retinoblastoma unilateral y también se conoce como retinoblastoma bilateral incompletamente expresado (Sorsby, 1972; Carlson *et al.* 1979; Gallie *et al.* 1990). Otra posibilidad que no debe descartarse es que alguno de los progenitores del caso índice tuviera una mutación constitucional heredada a partir de uno de sus padres y que viene segregando por la línea germinal, en este caso se presentaría el fenómeno de no penetrancia y el gen tendría expresividad fenotípica reducida es decir, un retinoblastoma bilateral incompletamente expresado.

- Casos bilaterales esporádicos

Las familias que presentaron estos casos fueron: Rb-5, Rb-6, Rb-7 y Rb-8 (tabla 1, fig. 9). Los casos índice tuvieron una edad de diagnóstico del retinoblastoma bilateral antes del año, no tienen antecedentes familiares de la neoplasia o de otras. Los casos índice de Rb-5,

Rb-7 y Rb-8 presentaron cariotipos normales, 46, XY. El caso índice de la familia Rb-6 presentó un cariotipo 47, XXY, var (1)(q12 GTG 44), var (1)(q12 GTG 14), (tabla 1, fig. 11). El análisis respecto al complemento cromosómico se comenta en la parte de citogenética de este apartado. Los casos bilaterales esporádicos se asocian con mutaciones nuevas en la línea germinal (Naumova y Sapienza, 1994) en los gametos de alguno de los progenitores y por lo tanto el individuo sería heterocigoto para el gen RB, teniendo una alta probabilidad de desarrollar retinoblastoma bilateral de ocurrir la segunda mutación en células de la retina. Aunque la edad de los padres en estas familias está dentro de la edad reproductiva óptima, hay autores que sugieren, una mayor posibilidad de alteración en el gameto masculino que dé lugar a individuos heterocigotos para el gen RB (Carlson *et al.* 1979; Gallie *et al.* 1990; Munier *et al.* 1994; Naumova y Sapienza, 1994; Stahl *et al.* 1994). Por otra parte en individuos con retinoblastoma bilateral esporádico, también pudo darse la mutación en el desarrollo temprano embrionario y si tanto las células somáticas como gonadales estuvieron involucradas en este proceso, las posibilidades de heredar el gen alterado a su descendencia son altas, al igual por supuesto que en el evento anterior.

En el caso particular de la familia Rb-6, se sabe por información complementaria, que los padres, al concebir al caso índice, contaban con una edad cercana a los 44 años, por ello se sugiere que existió una mutación *de novo* en células germinales de alguno de los progenitores y se propone que tuvo altas probabilidades de haber ocurrido en el gameto masculino, por una parte debido a la edad avanzada del progenitor y porque existen datos que han mostrado que las mutaciones germinales son más frecuentes en los alelos paternos porque la meiosis masculina puede estar más expuesta a agentes mutagénicos y/o la impronta génica hace más susceptible a mutaciones al gen RB paterno durante el desarrollo (Gallie *et al.* 1990; Munier *et al.* 1994; Naumova y Sapienza, 1994; Stahl *et al.* 1994). Sin embargo, es bien sabido que durante la ovogénesis también se tiene una alta probabilidad de acumular mutaciones, pero no hay reportes que comenten al respecto de éste proceso asociado a retinoblastoma, además la mayoría de alteraciones citogenéticas (traslocaciones y deleciones) en la región 13q14 que se han reportado asociadas con retinoblastoma, provienen de vía materna (Rivera *et al.* 1981; Strong *et al.* 1981; Michalová *et al.* 1982), por lo cual consideramos que las suposiciones que se hacen al respecto del origen parental de las mutaciones que predisponen a retinoblastoma están aún en proceso de ser comprobadas y por lo tanto no hay un consenso en cuales serían los mecanismos que propiciarán, en todo caso una mayor frecuencia de mutaciones en los gametos masculinos.

- Casos unilaterales heredados.

En el caso de la familia Rb-9 (tabla 1, fig. 9), el caso índice presentó retinoblastoma unilateral, tiene antecedentes de tres hermanos con el mismo padecimiento y familiares por vía paterna. Este tipo de herencia es la que se conoce como herencia colateral: no hay transmisión directa de la enfermedad de padres a hijos pero sí hay más de dos individuos en la misma generación (III-1, III-2, III-9, III-14; IV-2, IV-3, IV-4, IV-6) que la padecen, (Sorsby, 1972; Carlson *et al.* 1979; Zhu *et al.* 1989) por lo cual en esta familia se infiere del árbol genealógico que hay no penetrancia en los individuos II-4, II-6, II-8 y III-3 (Carlson *et al.* 1979) y se sugiere que estos son portadores del alelo que viene segregando con la enfermedad. A este tipo de herencia se le conoce también como "dominancia irregular" (Sorsby, 1972).

Además se observa en la tabla 1, que el cariotipo del caso índice y sus hermanos con retinoblastoma (fig.9, generación IV) fue normal, los tres varones 46, XY. Los cariotipos de ambos padres también fueron normales, debido a esto se propone que el mecanismo que está propiciando el desarrollo de retinoblastoma, es diferente a una delección del locus RB1 apreciable por método de citogenética de alta resolución (Sección 1.3 de este trabajo, Cavenne *et al.* 1985). Cualquiera que sea el mecanismo, se infiere que los individuos IV-2, IV-3, IV-4, IV-6 de esta familia, son heterocigotos constitucionalmente para la mutación en el gen RB la cual viene segregando por línea germinal. Además se trata de un retinoblastoma bilateral incompletamente expresado porque los 4 individuos lo presentaron forma unilateral (Sorsby, 1972; Voguel, 1979) por lo tanto, tienen una probabilidad del 50% de heredar dicho alelo a sus descendientes, con lo que aumenta el riesgo de desarrollar retinoblastoma en caso de sufrir el segundo evento mutacional en células somáticas.

- Casos bilaterales heredados

En la tabla 1, fig. 9, se observa que las familias Rb-10, Rb-11 y Rb-12 presentaron casos índice que padecieron retinoblastoma bilateral, además hay antecedentes de la neoplasia en los tres casos. En la familia Rb-10, se trata de un patrón de transmisión del retinoblastoma compatible con la herencia autosómica dominante (Sorsby 1972; Carlson *et al.* 1979; Zhu *et al.* 1989) debido a que la madre del caso índice padeció retinoblastoma. El complemento cromosómico de la madre fué normal 46, XX (Tabla 1) y no se pudo obtener el del caso índice por falta de muestra sanguínea. En este caso, se debe contemplar la posibilidad de que uno de los gametos de un progenitor de la madre (I-2) haya sufrido alteración en el gen RB y por lo tanto la madre es heterocigota para el mismo y de esta manera, el alelo mutado viene segregando por línea germinal hacia su descendencia (Gallie *et al.* 1990; Munier *et al.* 1994).

En la familia Rb-11, (tabla 1 y fig. 9) se observa un patrón de herencia colateral del retinoblastoma (Sorsby 1972; Carlson *et al.* 1979; Zhu *et al.* 1989), debido a que no existe transmisión

directa de padre a hijo pero sí se encuentran individuos con la neoplasia en la misma generación como es el caso de los individuos II-4 y II-7 y de los individuos III-4 y III-5. El caso índice presenta retinoblastoma bilateral pero sus antecesores padecieron retinoblastoma unilateral, por lo que se observa expresividad variable en esta familia, así como no penetrancia en el individuo II-2, el cual es portador del alelo que viene segregando con la enfermedad por vía paterna y por línea germinal, por lo tanto tienen una probabilidad del 50% de heredar el gen alterado a sus descendientes, con lo que aumenta el riesgo de desarrollar retinoblastoma en caso de perder la heterocigocidad en células somáticas.

En la familia Rb-12, (tabla 1, fig. 9) también es un retinoblastoma familiar bilateral con patrón de herencia colateral, tres hermanos del padre del caso índice (II-1, II-2, II-19) padecieron la neoplasia en forma bilateral, mientras que en éste (II-15) hubo no penetrancia y es portador del alelo que viene segregando con la enfermedad por vía germinal debido a que tres de sus hijos (III-13, III-15, III-16) también presentaron retinoblastoma bilateral, por lo que la expresividad de este cáncer es completa en la familia. Asimismo, el caso índice (III-16) y su hermana afectada (III-13) tienen una probabilidad del 50% de heredar a sus descendientes del gen alterado que predispone a retinoblastoma.

Los complementos cromosómicos de los casos índice y familiares en primer grado de las familias Rb-11 y Rb-12, no pudieron observarse debido a falta de muestra sanguínea.

Edad de inicio del retinoblastoma

La mayoría de los pacientes presentaron una edad de inicio de retinoblastoma que corresponde a lo que se ha reportado en la literatura, entre recién nacido y 5 años de edad (Shields, 1992) excepto el caso índice de la familia Rb-4 que tuvo una edad de 9 años al inicio del padecimiento (Tabla 1, Rb-4), muy avanzada para esta neoplasia embrionaria, por lo cual se conoce como Retinoblastoma tardío (Scriver *et al.* 1995). De hecho, en un estudio realizado en el Distrito Federal, Fajardo *et al.* (1996) comentan que hubo un mayor número de casos de retinoblastoma detectados entre recién nacido y 4 años de edad, 362 de 405, y solo 43 casos de entre 5-14 años. Sin embargo, a pesar de los no pocos reportes de casos de retinoblastoma en individuos hasta de 12 años (Yuge *et al.* 1995), no se ha planteado una hipótesis al respecto y las líneas de investigación que contemplen la embriogénesis del retinoblastoma son muy escasas.

Proporción de sexos en individuos con retinoblastoma

De las 12 familias estudiadas, se observó (tabla 1, fig. 9) que 4 de los casos índice son de sexo femenino y 8 corresponden a sexo masculino, del total de individuos que se reportan en los árboles genealógicos (fig. 9) y que padecieron retinoblastoma, 12 corresponden a sexo femenino, 15 a sexo masculino y de 3 de ellos no se supo el sexo. En las familias con retinoblastoma esporádico hubo solamente 3 casos índice de sexo femenino con retinoblastoma unilateral y 5 de sexo masculino, 4 de ellos con retinoblastoma bilateral.

Aunque el tamaño de muestra es pequeño, se observa un leve aumento en la proporción de individuos de sexo masculino que desarrollan retinoblastoma, por lo que considerando únicamente los casos índice (4 de sexo femenino, 8 de sexo masculino) se aplicó la prueba estadística de la X^2 con lo cual resultó que las diferencias en el sexo entre casos índice no fue estadísticamente significativa en el número de hombres y mujeres que padecen retinoblastoma para esta muestra.

En el estudio realizado por Fajardo *et al.* (1996) reportan 192 casos de retinoblastoma en sexo femenino entre recién nacido a 14 años y 213 casos de retinoblastoma en sexo masculino en el mismo periodo de vida. Adicionalmente, entre 1982-1991 se registró una frecuencia mayor de casos de retinoblastoma en el sexo masculino en el Distrito Federal, obteniendo una razón global hombre/mujer de 1.6 (Bravo *et al.* 1996). En las familias estudiadas en el presente trabajo se observó que en donde hay retinoblastoma heredado unilateral o bilateral (Rb-9, Rb-11, Rb-12 excepto en la Rb-10) el alelo mutado del gen que predispone a retinoblastoma, esta segregando por línea paterna.

Se ha visto que en los casos de enfermedad bilateral esporádica, donde hubo una alteración debida a mutación en las células germinales de los progenitores, el cromosoma 13 mutado corresponde, en la mayoría de los casos al de origen paterno (Dryja *et al.* 1989; Zhu *et al.* 1989). La explicación que se propone es que ésta mutación ocurre durante la espermatogénesis porque "el número de multiplicaciones celulares es mayor durante ésta que en oogénesis", además pudiera participar el proceso de impronta génica haciendo al gen RB1 paterno más susceptible a mutaciones durante el desarrollo (Kato *et al.* 1994; Stahl *et al.* 1994).

Aunque se han presentado datos que reflejan una distorsión de la segregación en la proporción de sexos de individuos que padecen retinoblastoma, no existen datos contundentes que apoyen el hecho de que un sexo sea mayormente afectado por la neoplasia (Munier *et al.*

1994). Sin embargo, respecto a esto y al efecto de la impronta génica Naumova y Sapienza (1994) (Introducción, apartado 1.3) plantearon la hipótesis que se refiere a que en el cromosoma X se encuentra un gen de impronta defectuoso en los varones que presentan el retinoblastoma bilateral esporádico, de esta manera, son incapaces de borrar la impronta materna de sus gametos y/o reestablecer la paterna en la proporción del genoma heredado de sus madres. La transmisión de algunos cromosomas con impronta materna a través de este varón, dará lugar a la formación de embriones no viables; sin embargo, el único embrión que sobrevivirá (cuando el progenitor femenino sea normal para ambos cromosomas) será el que reciba el conjunto de cromosomas con la impronta correcta del varón afectado: el cromosoma Y paterno y el alelo 13q que tiene el locus RB1 defectuoso, lo cual se ve reflejado en la desproporción de sexos y el desarrollo de retinoblastoma en los varones. Esta propuesta nos parece muy interesante y aunque es reciente, sería importante poner a consideración los estudios epidemiológicos hechos en México y buscar herramientas para poder corroborarla experimentalmente.

Origen de las familias

Por otra parte, también es importante comentar que 5 de las familias con casos índice esporádicos unilateral o bilateral provengan del estado de Chiapas, debemos considerar que el CMN S.XXI es un Hospital de concentración a donde se canalizan preferentemente los casos del sur de la República Mexicana y esto podría estar interfiriendo en la frecuencia encontrada respecto al origen de los individuos.

Se tienen antecedentes de un estudio epidemiológico realizado en México, en Hospitales del Distrito Federal (Fajardo *et al.* 1996) donde se encontró una incidencia de casos con Retinoblastoma de 4 en un millón de individuos comprendidos entre 1 y 4 años de edad durante 1992 y 1993. Asimismo, se observó que entre 1980 y 1991, el Retinoblastoma ocupó el cuarto lugar de frecuencia entre las neoplasias malignas en diversos estados de la República Mexicana y el segundo lugar en el estado de Chiapas en donde se encontró el mayor porcentaje de individuos que lo padecen. La explicación que dan a ello es que a los pacientes con este tipo de neoplasia se les canaliza para su atención en el DF, mientras que para el resto de las neoplasias no sucede lo mismo; también se comenta que el retinoblastoma no hereditario tiene lugar con mayor frecuencia en los estratos sociales bajos y Chiapas es una entidad con una gran número de población en esta condición. De tal forma que consideramos que las observaciones en cuanto a la frecuencia del retinoblastoma en México realizadas en este y en el trabajo citado, son un fuerte argumento para canalizar estudios epidemiológicos y genéticos hacia la comunidad chiapaneca.

Finalmente, concluimos que la información obtenida a partir de la elaboración de árboles genealógicos de familias mexicanas con retinoblastoma nos permitió inferir la genética de la neoplasia en cada caso y obtener datos de importancia respecto a la misma que podrían tomarse en cuenta en subsecuentes estudios.

2) Citogenética. Observación de cariotipos.

Con el propósito de identificar alteraciones en el cromosoma 13 observables al microscopio óptico en individuos con retinoblastoma, o si había alteraciones en los cromosomas de los casos índice que pudieran estar relacionadas con el padecimiento, se decidió realizar el cariotipo del caso índice en todas las familias.

Como ya se mencionó en material y métodos, la técnica utilizada para la observación de metafases consistió en obtener cromosomas de alta resolución teñidos por bandas G, para esto se utilizó el agente Metotrexate con la finalidad de acumular un máximo número de células en prometafase al bloquear la síntesis de DNA. Después de un tiempo determinado, se liberaron células del bloqueo, se adicionó Timidina y en algunos casos Bromodeoxiuridina (análogos de nucleósidos) para sincronizar los cultivos y obtener el mayor número posible de células en profase tardía, metafase temprana y metafase media (Yunis, 1976; Ram y Babu, 1994; Richardson *et al.* 1994). Con éste método se observó incremento en el índice mitótico y una descondensación cromosómica que permitió observar en muchos casos una elongación muy aceptable de la región 13q14, incluso llegándose a distinguir las bandas 13q14.1, 14.2 y 14.3.

En los resultados de la tabla 1 se observa que ninguno de los individuos en los cuales se realizó el cariotipo, presentó deleciones en la banda 13q14 evidenciables al microscopio. En la figura 10 se muestra un ejemplo de las metafases observadas con un complemento cromosómico normal.

El caso índice de la familia Rb-6 (fig. 9) presentó un complemento cromosómico 47, XXY var (1)(q12 GTG 44), var (1)(q12 GTG 14) (tabla 1, fig. 10), corresponde a un cariotipo asociado con el Síndrome de Klinefelter, descrito en 1942 y caracterizado por presentar generalmente disgenesia testicular, ginecomastia y excreción elevada de gonadotropinas, en muchos casos existe esterilidad y el coeficiente intelectual está comunmente dentro de los límites normales. Para este complemento cromosómico en particular, se considera que la presencia de un cromosoma X extra se origina de una no-disyunción meiótica paterna o materna, por lo tanto para descartar el origen de este cromosoma, se sugiere realizar estudios de marcadores para el cromosoma X tanto en los padres como en el caso índice con la finalidad de establecer a que progenitor corresponde la no disyunción. Debido a que este síndrome no presenta manifestaciones clínicas sino hasta

después de la pubertad, el hallazgo fué casual al estar buscando citogenéticamente la delección en el cromosoma 13 y por lo tanto es importante ya que se puede canalizar al individuo a recibir terapia adecuada oportunamente. No se ha descrito asociación de éste síndrome con retinoblastoma, aunque sí se ha propuesto que la leucemia crónica y otros tipos de cáncer se presentan con mayor frecuencia que lo esperado, sin ser esto concluyente, la única relación clara es que los individuos con Klinefelter presentan con mayor frecuencia cáncer de mama que los varones normales (Gufzar, 1994).

La nomenclatura citogenética de este cariotipo 47, XXY, var (1)(q12 GTG 44), var (1)(q12 GTG 14), significa que el individuo tiene 47 cromosomas, el cromosoma extra es un X, además tiene un polimorfismo en el par de cromosomas 1 en la banda q12 (fig. 11), el cual se observó en tinción de bandas G (coloración de Giemsa) previo tratamiento de los cromosomas con tripsina (GTG). Este polimorfismo corresponde al tipo del de constricciones secundarias donde se localiza heterocromatina constitutiva, los números 44 se refieren a que ese cromosoma tiene un tamaño equivalente a 4 y una intensidad de 4 (Fig. 11, 1qh+); los números 14, se refieren a que el cromosoma tiene un tamaño que equivale a 1 y una intensidad de 4 (Fig.11, 1qh-) esta nomenclatura esta reportada de acuerdo al ISCN. (Salamanca, 1992; ISCN, 1995).

Respecto a que no se encontraron delecciones en las metafases observadas en este trabajo, se reporta que del total de casos con retinoblastoma, del 5-8% presentan delecciones en el cromosoma 13 región q14, observables al microscopio (Knudson, 1993; Stahl *et al.* 1994). Además, del 2-5% de los casos con retinoblastoma bilateral incompletamente expresado, presentan una delección constitutiva en el cromosoma 13 q14 en linfocitos de sangre periférica, como resultado de mutaciones germinales (Murphree y Benedict, 1984).

Son pocos los reportes en donde se observa la delección del cromosoma 13 en individuos con retinoblastoma, además estas delecciones son muy aparentes, desde las más grandes reportadas que corresponden al Síndrome de 13q- en cuyo caso, los individuos además de presentar retinoblastoma tienen otras anomalías congénitas y retraso mental (Michalová *et al.* 1982; Kondo *et al.* 1985); delecciones que abarcan un segmento apreciable del cromosoma 13q, como pérdidas de toda la banda 13q14 o aquellas que abarcan entre el segmento 13q12 al 13q31 (Knudson *et al.* 1976; Yunis y Ramsay, 1978; Motegi, 1981; Rivera *et al.* 1981; Strong *et al.* 1981; Motegi, 1982; Motegi *et al.* 1983; Salamanca *et al.* 1984; Fukushima *et al.* 1987) en este caso además del retinoblastoma, los afectados cursan con retraso mental, facies característica, anomalías congénitas etc. Las delecciones más pequeñas reportadas que se encontraron en la literatura revisada fueron de dos casos una 13q14.1-14.3 (Motegi, 1981) en la que el individuo únicamente presentó retinoblastoma y la misma delección la infiere Yunis y Ramsay (1978), sólo que éste paciente además presentó retraso mental.

En cuanto a las observaciones realizadas en este trabajo, se encontraron metafases que presentaban la resolución suficiente para distinguir la banda 13q14.2 en uno de los cromosomas, sin embargo, en su homólogo no se observaba. Este hecho se repitió tanto en individuos que padecieron retinoblastoma como en los que no, por lo cual no favorecemos la pérdida de la región 13q14.2 pero sí apoyamos a que esto se deba a un efecto de condensación, situación normal en los cromosomas homólogos de cualquier par, este efecto también lo contemplaron Yunis y Ramsay (1978) y Motegi (1981) quienes asumen la pérdida de material genético en la región 13q14 que se ve más corta en uno de los cromosomas y porque no logran distinguir la banda 13q14.2. Es importante señalar que se han detectado una amplia gama de mutaciones sobre el gen de retinoblastoma que van desde la eliminación de un par de bases a varias de ellas y por lo tanto estas microdeleciones no son observables al microscopio, además los mecanismos de inactivación del gen RB son diversos (Sección 1.3 de la introducción) por otra parte, se han encontrado alteraciones a nivel de metilación en el promotor del gen y también a nivel de transcripción donde se ha predicho alteración de la proteína de retinoblastoma, aunado a esto, considerando el bajo porcentaje de individuos que pueden presentar delección aparente en el cromosoma 13 en linfocitos de sangre periférica, estas delecciones generalmente abarcan varias bandas del mismo y frecuentemente los individuos presentan anomalías adicionales, es comprensible que en ninguno de los casos índice se presentara dicha delección. Por otra parte Motegi (en Gallie *et al.* 1990) ya había contemplado que las técnicas citogenéticas pueden no ser suficientemente confiables para distinguir entre delecciones muy pequeñas y artefactos de preparación tal como la condensación de las bandas. Debido a que no se evidenciaron pérdidas en 13q14 por medio de bandas de alta resolución en los individuos estudiados en este trabajo y que padecen retinoblastoma, se sugiere, por lo tanto, que sería conveniente implementar en un futuro técnicas como la de Hibridación *in situ* por Fluorescencia (FISH) la que ya se ha aplicado utilizando sondas para RB1 (Lemieux *et al.* 1994) para lo cual los autores reportan un alto nivel de resolución en los cromosomas observados. También se podría contemplar el uso de otras técnicas que evidenciaran alteraciones genéticas con la finalidad de detectar microdeleciones al microscopio como la de Hibridación *in situ* al Microscopio electrónico (EMISH) y la técnica conocida como Primer marcado *in situ* (PRINS) (Buckle *et al.* 1994; Inazawa *et al.* 1994; Lemieux *et al.* 1994).

Otro tipo de técnicas utilizadas para evidenciar mutaciones que rebasan el nivel citogenético y se ubican a nivel molecular son la de PCR múltiple (Lohmann *et al.* 1992), la de polimorfismos de conformación de cadena sencilla, SSCP (Lohmann *et al.* 1996); electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante, DGGE (Blanquet *et al.* 1993 y 1995) y la de electroforesis en gel de campo pulsante, PFGE (Janson y Nordenskjöld, 1994).

3) Genética molecular. Análisis de ligamiento.

Cuando en una familia se ha detectado un individuo con retinoblastoma se realiza un estudio oftalmológico en todos los familiares de primer grado que estén en edad de desarrollar la neoplasia con la finalidad de saber si pueden presentar evidencia de tumoraciones. Los exámenes oftalmológicos son muy eficientes, sin embargo existen varios inconvenientes entre los cuales esta el hecho de que los aparatos utilizados son costosos y no están siempre disponibles, el tiempo requerido para cada sesión de observación es largo debido a que el individuo a examinar debe estar anestesiado o bien, debe tener edad suficiente para controlar el movimiento de las órbitas oculares, las observaciones se hacen periódicamente como mínimo cada dos meses, además, el desconocimiento de los signos y la idiosincracia de la población, hacen que se detecte tardíamente la neoplasia, que como tal, avanza rápidamente una vez que se ha presentado el primer foco de tumoración.

Debido a lo anterior, consideramos necesario implementar un método que permitiera identificar a los individuos en riesgo de desarrollar retinoblastoma o bien a los portadores del alelo que predispone a la neoplasia para apoyar el asesoramiento genético de manera oportuna y confiable, para lo cual se utilizó un marcador tipo VNTR.

Los VNTR son una de las secuencias marcadoras más útil en los análisis de segregación debido a que presentan un alto grado de polimorfismo de DNA, se heredan de manera mendeliana y se pueden usar en familias con al menos 2 individuos afectados por una enfermedad como el retinoblastoma para determinar el riesgo a padecerlo. Para disminuir un mal diagnóstico y descartar eventos de recombinación entre el marcador y la mutación, es conveniente utilizar varias secuencias intragénicas (Nakamura *et al.* 1987; Munier *et al.* 1994; Stahl *et al.* 1994). Por ello, en este trabajo se eligió la amplificación del VNTR del intron 16 del gen RB como un marcador de ligamiento a la enfermedad. Este marcador había sido valorado anteriormente (Scharf *et al.* 1992) en una población hispana residente en Estados Unidos donde resultó ser heterocigoto en un 50% de los individuos.

Cabe destacar que a diferencia del método utilizado por Scharf *et al.* (1992) en este trabajo se logró amplificar el VNTR de intrón 16 en condiciones tales, que los productos pudieron evidenciarse directamente en geles de agarosa sin necesidad de utilizar una sonda marcada para observarlos por Southern blot, evitando así consumo de tiempo y dinero en esta técnica.

Las familias que pudieron ser analizadas con este método fueron aquellas que presentaron al menos dos individuos con retinoblastoma como es el caso de las familias Rb-9,

Rb-10 y Rb-11. La familia Rb-12 también fue candidata al análisis por este método pero no se obtuvieron las muestras sanguíneas de los individuos.

Los alelos amplificados para todas las familias, cayeron en el tamaño que ya se había determinado para el polimorfismo, el cual tiene un rango de de 650 a 1800 pb, siendo el tamaño más común en la población Hispano-Mexicana el de 1450 pb que ocurre con una frecuencia del 69% (Scharf *et al.* 1992) y a cuyo tamaño se acercan los alelos amplificados en este estudio.

En dos de las tres familias estudiadas (Rb-10 y Rb-11), el intron 16 del gen RB resultó ser adecuado para proveer información de ligamiento con el retinoblastoma. La familia Rb-9 resultó ser no informativa debido a que todos los individuos de la misma fueron homocigotos para el VNTR estudiado. Desde luego que debido al tamaño de la muestra no se podría en este momento, extrapolar esta información a la población mexicana; por tal motivo sería interesante incrementar el tamaño de la muestra y seguir evaluando la utilidad de este marcador en pruebas de diagnóstico molecular ya que es un marcador confiable debido a que se encuentra dentro del gen de retinoblastoma y el efecto de interpretaciones erróneas como resultado de la recombinación meiótica es escaso (Nakamura *et al.* 1987; Sthal *et al.* 1994).

Debido a que el VNTR del intron 16 del gen de retinoblastoma no es el único marcador intragénico que se ha detectado en el gen RB, y además, se tienen antecedentes de que la población hispana presenta un 50% de heterocigocidad para este marcador, se podrían evaluar en la población mexicana los otros VNTR intragénicos del gen RB conocidos para estimar su grado de heterocigocidad y por lo tanto su utilidad informativa (Yandell y Dryja, 1989; Brandt *et al.* 1992; Lohmann *et al.* 1992).

Este tipo de estudios moleculares son importantes porque la información que se obtiene de ellos nos permite descartar a los individuos que no heredaron el alelo que predispone a retinoblastoma y por lo tanto tendrán una probabilidad muy baja de desarrollar la neoplasia, de esta manera no será necesario someterlos a revisiones continuas por métodos de oftalmoscopia. También nos permite conocer si una persona que no tuvo retinoblastoma, ocasionado por el fenómeno de penetrancia incompleta, puede heredar a sus hijos la predisposición a la enfermedad. De esta forma, al poder identificar a los individuos con predisposición se detectaría de manera más oportuna la aparición de los primeros focos de tumor para combatirlos adecuadamente; así también se puede aplicar el método en el diagnóstico prenatal para individuos en posible riesgo de desarrollar la neoplasia.

4) Inmunohistoquímica. Observación de los retinoblastomas

En este trabajo se revisaron 7 retinoblastomas (tabla 2) los cuales se tiñeron por técnica de inmunohistoquímica para la proteína pRB, las muestras histológicas corresponden a algunos casos índice de las familias estudiadas (figura 9). El tumor RBT-2 corresponde al caso índice de la familia Rb-2; el tumor RBT-4, al caso índice de la familia Rb-4 y así sucesivamente, los tumores RBT-7 y RBT-7a corresponden al caso índice de la familia Rb-7.

Inmunohistoquímica de tejido normal

En el corte histológico de ojo normal teñido con H-E (fig. 15) se observó la estructura de la retina con sus diferentes capas, como se puede comparar con la figura 1 (Introducción, sección I.1, figura 1). Esta tinción nos permitió verificar la calidad de fijación del material tanto en el control como en los retinoblastomas y además evidenciar que existieran áreas de tumor en las muestras histológicas de retinoblastomas para poder utilizarlas en la detección inmunohistoquímica.

En el corte de ojo normal donde se realizó la técnica de inmunohistoquímica (fig. 16) se observó una heterogeneidad de la tinción para la pRb en las capas nucleadas de la retina: la nuclear externa (B) de tinción mediana a débil se compone principalmente de núcleos de células de fotorreceptores; la capa nuclear interna (D) que incluye núcleos de células ganglionares y amácrinas, mostró aproximadamente el 50% de núcleos positivos con intensidades entre alta, mediana y débil, siendo estas dos últimas, las más frecuentes encontradas entre los núcleos, el otro 50% de los núcleos fue negativo. Por último, la capa de células ganglionares (F), que presentó escasos núcleos, pocos de ellos fueron negativos y la mayoría dieron una tinción positiva para la pRB.

Cordon-Cardó y Richon (1994) realizaron un estudio donde observaron el patrón de expresión de la proteína pRB en diferentes tejidos humanos normales, incluyendo la retina, para lo cual utilizaron el anticuerpo anti-RB de tipo monoclonal, que reconoce tanto formas hiper e hipofosforiladas de la proteína, como el utilizado en este trabajo. En el caso de la retina, observaron que la tinción de la proteína fue heterogénea, entendiendo por esto diferentes grados de tinción cuando ésta fue positiva para pRB, así como tinción negativa para la misma. En la capa nuclear interna encontraron inmunorreactividad nuclear mediana. La capa nuclear externa mostró un patrón de tinción débil y heterogéneo (núcleos positivos y negativos para la pRB). A pesar de la escasa información de la inmunohistoquímica para la

pRB en retina en este trabajo, los resultados parecen concordar con lo que se observó en nuestro estudio para la retina normal.

El hecho de que una misma capa nuclear de las que conforman la retina, presente células negativas y positivas con diferente intensidad, se explicaría porque las células se podrían encontrar en diferente fase de diferenciación. Hay evidencias de que la expresión de pRB varía de acuerdo a la diferenciación en diversas líneas celulares de ratón. Se observó que la mayor cantidad del mRNA de RB1 correlacionó con células que se encontraban terminalmente diferenciadas y sin división celular, tal fue el caso de células MEL (Mouse erythroleukemia), línea de mioblastos S2 y células B linfoides (Coppola *et al.* 1990).

En la figura 17 se muestra una retina normal que fue el control negativo para la técnica de inmunohistoquímica y al cual no se le puso el primer anticuerpo Rb C-15.

Inmunohistoquímica de retinoblastomas

Con respecto a los siete tejidos tumorales estudiados, los grados de diferenciación observados fueron: tumor diferenciado en rosetas de Flexner-Wintersteiner (figs. 18 y 19), masa tumoral indiferenciada (fig. 20) y la estructura normal de la retina junto con zonas tumorales (fig. 21). Además en algunos retinoblastomas se pudieron observar las tres morfologías mencionadas (tabla 2).

Estudios previos de inmunohistoquímica en retinoblastomas se encaminaron a determinar el origen de las células tumorigénicas. Algunos de los marcadores más utilizados fueron marcadores específicos de células neuronales como la Enolasa específica de neurona (NSE) usada como marcador específico de la misma, la proteína ácida fibrilar de la glía, usada como marcador de astrocitos; glicoproteína asociada a mielina, para identificar células de Müller en la retina y proteína S-100, encontrada en astrocitos y oligodendrocitos. Con estos marcadores se concluyó que el retinoblastoma deriva de células neuronales y la hipótesis más aceptada a la fecha es que estos tumores derivan de una célula precursora llamada retinoblasto que es capaz de diferenciarse en más de una dirección (Ts'o *et al.* 1970; Molnar *et al.* 1984; Yuge *et al.* 1995).

En este trabajo, el retinoblastoma RBT-5 mostró diferenciación en rosetas y fue el único con tinción homogénea negativa para la detección inmunohistoquímica de pRB. Esta última observación es la que se esperaba para todos los tumores, sin embargo la mayoría de ellos presentaron tinción positiva para la pRB con diferentes grados de intensidad.

Hubo retinoblastomas como RBT-6 y RBT-7a donde se observaron zonas de tumor diferenciado en rosetas y que fueron positivos para la tinción de la pRB. En ellos predominaron los núcleos positivos de intensidad mediana a débil y hubo pocos núcleos

negativos. La presencia de rosetas en un retinoblastoma se conoce también como neuroepitelioma o retinoblastoma neuroepiteliomatoso, esta formación ha sido interpretada como un intento de reproducir el epitelio primitivo del tubo neural o las células receptoras visuales más altamente especializadas de la retina (Popoff y Ellsworth, 1971).

Las células que forman rosetas tienen características morfológicas que indican el origen neuronal del retinoblastoma, confirmando que éste proviene de retinoblastos con potencial de diferenciación en fotorreceptores y neuronas (Ts'o *et al.* 1970; Yi *et al.* 1994; Yuge *et al.* 1995). Popoff *et al.* (1971) sugiere que las transformaciones nucleares observadas en retinoblastomas como la marginación de la cromatina pueden representar una exageración patológica de un fenómeno el cual aparentemente existe normalmente en retinoblastos en maduración. En su trabajo sobre la estructura del retinoblastoma, reporta la observación de células en mitosis entre las células que forman rosetas. También vió formas nucleares que indican degeneración celular tales como la distribución periférica de cromatina condensada, observación que concuerda muy bien con lo encontrado en este trabajo.

Los retinoblastomas que mostraron zonas de tumor indiferenciado presentaron tinciones nucleares que van predominantemente de mediana a débil y con escasos núcleos negativos. Las figuras mitóticas aberrantes se observan con frecuencia en este tipo de tumores tales como metafases y anafases, en este caso la localización de la proteína fue en el citoplasma. Geradts *et al.* (1994) habían observado localización citoplasmática de la proteína y sugirieron que esto se debe a que durante la mitosis se pierden las barreras nucleares lo que permite que las proteínas nucleares como pRB se diseminen en el citoplasma y por ello sea posible detectarlas ahí.

Es interesante notar que en este tipo de tumores se observaron frecuentes núcleos que sugerían la morfología de células en apoptosis. La apariencia de éstas células concuerda con los núcleos picnóticos, material nuclear fragmentado y densamente compactado. En un trabajo realizado con células de la línea SAOS, Haas-Kogan *et al.* (1995) sugirieron que la pRb puede participar en la supresión de apoptosis y que varias proteínas que inducen este proceso tales como E1A, E2F y c-myc, lo hacen al interferir con la función protectora de pRB, por lo cual si la pRB no está presente o está mutada, habrá más células que estén en apoptosis. Lo anterior podría considerarse como una alternativa para explicar la presencia de las células con morfología de apoptosis que se observaron en algunos de los retinoblastomas de este trabajo.

En los tumores que presentaron porciones de retina se puede apreciar que la tinción que se observó en los núcleos fue muy heterogénea, aunque la morfología de la retina es aparentemente normal en algunas regiones, los patrones de tinción de las tres capas nucleadas se semejan a la retina de un individuo normal, por lo cual se puede pensar que estas regiones no se han alterado, de hecho se sabe que el retinoblastoma se origina por células que forman

sus líneas tumorogénicas y de ahí la existencia de los foci tumorales (Shields, 1992; Scriver *et al.* 1995) así que no necesariamente están involucradas todas las células de la retina.

El hecho de que exista diferente inmunorreactividad para la pRB tanto en células de roseta como en células de tumor no diferenciado pudiera tener varias explicaciones:

a) en núcleos negativos para la detección de pRB se puede sugerir que al no estar presente dicha proteína (la cual se ha propuesto tiene el control primordial en el ciclo celular de células de la retina (Tso, 1989; Gallie *et al.* 1990; Cobrinik *et al.* 1992; Chen *et al.* 1995)) se pierde la función represora del ciclo celular que debiera ejercer pRB en los retinoblastos en vías de proliferación y diferenciación y por lo tanto da origen al tumor.

b) en núcleos positivos para la detección de pRB se podrán sugerir varias alternativas, una de ellas es que la proteína podría estar presente en su forma no-funcional (hiperfosforilada) y por lo tanto inactiva como consecuencia de la formación de complejos principalmente con CDK's que se encargan de fosforilar diferencialmente a pRB en ciertas fases del ciclo celular (Bates *et al.* 1994; Mittnacht *et al.* 1994; Antelman *et al.* 1995; Graña y Reddy, 1995; Weinberg, 1995; Knudsen y Wang, 1996).

c) Otra explicación es que al detectarse pRB pudiera estar presente pero formando complejos con proteínas celulares o virales que estarían reprimiendo su actividad de proteína supresora del ciclo celular (De Carpio *et al.* 1984; Lee *et al.* 1987; Kaelin *et al.* 1991; Levine *et al.* 1992; Nevins, 1992; Huang *et al.* 1993; Mudrak *et al.* 1994; Riley *et al.* 1994; Cobrinik, 1996; Ikeda *et al.* 1996).

d) finalmente, la presencia de pRB en los retinoblastomas estudiados pudiera deberse a una proteína mutada que no se degradó y estaría presente sin ejercer su función o bien tener una función incompleta con base en que se han encontrado mutaciones en las cuales se predice la alteración que puede sufrir la proteína, desde no estar presente o tener función parcial (Dryja *et al.* 1986; Friend *et al.* 1987; Dunn *et al.* 1989; Horowitz *et al.* 1989; Bia y Cowell, 1995; Blanquet *et al.* 1995; Lohmann *et al.* 1996).

En el caso de retinoblastomas, sólo se cuenta con un trabajo (Yuge *et al.* 1995) en el cual se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-proteína retinoblastoma y en todos los ejemplares, la expresión de la proteína pRB estuvo ausente, contrario a lo que se encontró en este trabajo.

Una de las consideraciones que se debe hacer al respecto es que no tenemos información hacia donde se dirige el anticuerpo usado por Yuge ni tampoco en que grado de fosforilación detecta la pRB, por tal motivo no se pudo hacer una correlación de técnicas entre su trabajo y el nuestro.

Por lo anterior se concluye que de acuerdo a las observaciones inmunohistoquímicas, se pudo identificar en la mayoría de los cortes histológicos de ojos con retinoblastoma la presencia de la proteína pRB usando un anticuerpo policlonal contra la misma, dado que es una observación que no se esperaba, se proponen en este trabajo varias posibles hipótesis

para explicar su presencia y consideramos que cualquiera de ellas podría ser de interés para valolarla experimentalmente.

Además, con las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in Situ*, se han realizado diversos trabajos para detectar la expresión del gen RB en diferentes tipos de células tumorales. Estos estudios han permitido determinar la presencia de la proteína pRB así como el nivel de su mRNA con la finalidad de conocer la importancia de la pérdida de RB en el desarrollo de los tumores; en general se han encontrado alteraciones citogenéticas y moleculares diversas en el genoma junto con las alteraciones de RB1, por lo cual están aún en estudio otros tejidos oncogénicos y la relación que guardan entre sí estas alteraciones para explicar la transformación celular (Harbour *et al.* 1988; Lee, 1988; T'Ang *et al.* 1988; Dunn *et al.* 1989; Cance *et al.* 1990; Coppola *et al.* 1990; Hensel *et al.* 1990; Xu *et al.* 1991; Cordon-Cardo y Richon, 1994; Geradts *et al.* 1994; Zhang *et al.* 1994).

Debido a que varios de los tumores estudiados en este trabajo presentaron tinción positiva para la pRB, sería de interés en un futuro, realizar estudios de hibridación *in situ*.

VIII. CONCLUSIONES

De los estudios realizados en este trabajo se concluye lo siguiente:

1) De las familias mexicanas con retinoblastoma estudiadas en este trabajo, 66% correspondieron a casos esporádicos y 34 % a casos heredados.

2) Debido a que otros mecanismos diferentes a la pérdida de la región 13q14 deben estar involucrados con mayor frecuencia para el desarrollo de retinoblastomas, en ningún caso se observó esta alteración en los individuos estudiados por técnica de citogenética de alta resolución, por lo cual se recomienda ya no utilizar este método en estudios posteriores y hacer uso de otros que permitan un mayor grado de resolución para distinguir deleciones.

3) El VNTR del intron 16 del gen de retinoblastoma resultó ser informativo en el análisis de ligamiento en dos de las familias que fueron heterocigotas para el mismo, no así en la familia Rb-9 que resultó ser homocigota para este alelo.

4) A pesar de que anteriormente se había planteado la ausencia de la proteína de retinoblastoma en la formación de los tumores, se encontró en este trabajo que el 85% de retinoblastomas sometidos a inmunohistoquímica presentaron una tinción positiva heterogénea para pRB, lo cual no se esperaba y por lo tanto se proponen diferentes mecanismos por los cuales dicha proteína se puede encontrar presente sin ejercer su función.

5) Consideramos que para mejorar la información del asesoramiento genético debemos contar con elementos que nos permitan reconocer el origen de la mutación, la vía de segregación y los individuos susceptibles a padecer retinoblastoma, en los casos esporádicos la información que se puede utilizar es la obtenida del estudio citogenético; en los casos heredados, la información del análisis de ligamiento, al menos en 2 familias, resulta muy útil para dar un diagnóstico más exacto.

Adicionalmente, las observaciones obtenidas a partir de la inmunohistoquímica podrían ser de gran valor para predecir la malignidad de la neoplasia y servir como pauta para dar el mejor tratamiento a la enfermedad, aunque en este respecto todavía hay muchas suposiciones que deberán ser revisadas pero pensamos que con este estudio se abre una gran perspectiva de investigación.

IX. PERSPECTIVAS

- Es necesario contar con una mayor cantidad de familias mexicanas con retinoblastoma para continuar realizando investigaciones al respecto, el campo de estas es muy extenso en dicha neoplasia y para ello deberían aplicarse las estrategias de coordinación y colaboración científica así como el apoyo a familias que desean participar en los estudios.

- Sería importante realizar un estudio epidemiológico exhaustivo con la finalidad de detectar en que partes de la República Mexicana se encuentran más casos con retinoblastoma y por lo tanto ofrecer las técnicas de diagnóstico oportuno y búsqueda de mutaciones para evitar en lo posible la disminución de la calidad de vida de los individuos afectados.

- Debido a que la frecuencia de pérdida de material genético en la región 13q14 observable por métodos de citogenética de alta resolución es muy baja, se sugiere que en lo futuro, los análisis citogenéticos se optimicen utilizando técnicas tales como la de FISH para la detección más fina y rápida de esta deleción y/o utilizar métodos moleculares que den información respecto a la búsqueda de mutaciones, uno de los más recomendados sería el implementación del PCR múltiple a lo largo del gen.

- En el caso del caso índice de la familia Rb-6 se propone realizar un estudio de marcadores en los cromosomas X de los individuos de dicha familia para saber de cual progenitor proviene el cromosoma X adicional encontrado en el caso índice

- Sería recomendable determinar la heterocigocidad del VNTR intron 16 del gen de retinoblastoma en población mexicana y ampliar la muestra de retinoblastomas familiares con la finalidad de evaluar su utilidad en la detección de portadores. Asimismo podrían utilizarse otro tipo de marcadores VNTR para usarse en familias en las que no fué informativo el VNTR intron 16, como en la familia RB-9, que fué homocigota para dicho marcador.

- Se recomienda realizar estudios de Hibridación *in Situ* para la detección del mRNA del gen de retinoblastoma con la finalidad de correlacionarlo con el estudio inmunohistoquímico y predecir a que nivel se encuentra la alteración del gen RB1.

- Debido a la observación de células que sugieren figuras apoptóticas, se recomienda realizar una técnica de detección de células en apoptosis en los retinoblastomas para evaluar la presencia y la proporción de la misma en los tumores revisados.

X. BIBLIOGRAFIA

- Abramson, D; Fusco, R; Ellsworth, R; Tretter, P; Kitchin, D. The management of Unilateral Retinoblastoma without Primary Enucleation. (1982). Arch. Ophthalmol. 100: 1249-1252.
- Abramson, D; Ellsworth, R; Kitchin, F; Tung, G. Second nonocular tumors in retinoblastoma survivors: Are they radiation induced? (1984). Ophthalmol. 91:1351
- Adler, R; Farber, D. 1986. The Retina. A model for Cell Biology Studies. Vol. I. Academic Press, Inc. New York.. p.230 .
- Antelman, D; Macheimer, T; Huyghe, B; Shepard, M; Maneval, D; Johnson, D. Inhibition of tumor cell proliferation *in vitro* and *in vivo* by exogenous p10RB , the retinoblastoma tumor suppressor protein. (1995). Oncogene. 10:697-704.
- Armed Forces Institute of Pathology. 1960. Manual of Histologic Staining Methods. McGraw Hill Book Company. USA. 3a ed. p. 95.
- Bates, S; Parry, D; Bonetta, L; Vousden, K; Dickson, C; Peters, G. Absence of cyclin D/cdk complexes in cells lacking functional retinoblastoma protein. (1994). Oncogene. 9:1633-1640.
- Bia, B; Cowell, J. Independent constitutional germline mutations occurring in the RB1 gene in cousins with bilateral retinoblastoma. (1995). Oncogene. 11:977-979.
- Blanquet, V; Turleau, C; Gross, M; Goossens, M; Besmond, C: Identification of germline mutations in the RB1 gene by denaturant gradient gel electrophoresis and polymerase chain reaction direct sequencing. (1993). Hum. Mol. Genet. 2:975-979.
- Blanquet, V; Turleau, C; Gross-Morand, M; Sénamaud-Beaufort, C; Doz, F; Besmond, C. Spectrum of germline mutation in the RB1 gene: a study of 232 patients with hereditary and non hereditary retinoblastoma. (1995). Hum. Mol. Genet. 4:383-388.
- Bloch, B. Biotinylated Probes for In Situ Hybridization Histochemistry: Use for mRNA Detection. (1993). J. Histochem. Cytochem. 41: 1751-1754.
- Bookstein, R; Lee, E; To, H; Young, L; Sery, T; Hayes, R; Friedmann, T; Lee, W. Human retinoblastoma susceptibility gene: Genomic organization and analysis of heterozygous intragenic deletion mutants. (1988). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:2210-2214.
- Bowcock, A; Farrer, L; Hebert, J; Bale, A; Cavalli-Sforza, L. A contiguous linkage map of chromosome 13 q with 39 distinct loci separated on average by 5.1 centimorgans. (1991). Genomics. 11:517-529.

- Brandt, B; Greger, V; Yandell, D; Passarge, E; Horsthemke, B. A Simple and Nonradioactive Method for Detecting the Rb1.20 DNA Polymorphism in the Retinoblastoma Gene. (1992). *Am. J. Hum. Genet.* 51: 1450-1451.
- Bravo, J; Mendoza, H; Fajardo, A. Algunas características epidemiológicas del retinoblastoma en niños residentes del Distrito Federal. (1996). *Bol Med Hosp Infant Mex.* 53:234-239.
- BOEHRINGER Mannheim Biochemica. Cat. 1175041. DIG nucleic acid detection Kit. 1994.
- Buckle, V; Kearney, L. New methods in cytogenetics. (1994). *Curr. op. in genet & Dev.* 4:374-382.
- Cance, W. G; Brennan, M.F; Dudas, M.E; Huang, C.M; Codon-Cardo, C. Altered expression of the retinoblastoma gene product in human sarcomas. (1990). *N. Eng. J. Med.* 323: 1457-1462.
- Carlson, E; Letson, R; Ramsay, K; Desnik, R; Factors for improved genetic counseling for retinoblastoma based on a survey of 55 families. (1979). *Am. J. Ophthalmol.* 87: 449-459.
- Cavenee, W; Dryja, T; Phillips, R; Benedict, W; Godbout, R; Gallie, B; Murphree, A; Strong, L; White, R. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. (1983). *Nature.* 305: 779-784.
- Cavenee, W; Hansen, M; Nordenskjold, M; Kock, E; Maumenee, I; Squire, J; Phillips, R; Gallie, B. Genetic origin of mutations predisposing to retinoblastoma. (1985). *Science.* 228: 1051.
- Chen, P. Riley, D; Lee, W. The Retinoblastoma Protein as a Fundamental Mediator of Growth and Differentiation Signals. (1995). *Crit. Rev in Euk Gene Expr.* 5:79-95.
- Cobrinik, D; Dowdy, S; Hinds, P; Mittnacht, S; Weinberg, R. The retinoblastoma protein and the regulation of cell cycling. (1992). *TIBS* 17: 311-315.
- Cobrinik, D. 1996. The E2F gene family. Ed. Springer p. 141.
- Coppola, J.A; Lewis, B. A; Cole, M.D. Increased Retinoblastoma gene expression is associated with large stages of differentiation in many different cell types. (1990). *Oncogene.* 5:1731-1733.
- Cordon-Cardo, C; Richon, V.M. Expression of the Retinoblastoma Protein Is Regulated in Normal Human Tissues. (1994). *Am. J. Pathol.* 144: 500-510.
- Cormack, D. H. 1987. *Histología de HAM.* 9a ed. Ed. HARA, Mex. p.892.

- Czeizel, A; Csósz, L; Gárdonyi, J; Remenar, L; Ruziska, P. Chromosome studies in twelve patients with Retinoblastoma. (1974). *Humagenetik.* 22: 159-166.
- DAKOPATS. Immunoenzymatic staining Kits. Dako monoclonal Kit system. 1994.
- De Carpio, J; Ludlow, J; Lunch, D; Furukawa, Y; Griffin, J; Piwnica-Worms, H; Huang, C; Livingston, D: The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. (1984). *Cell.* 58: 1085-1095.
- Dryja, T; Rapaport, J; Joyce, J; Petersen, R. Molecular detection of deletions involving band q14 of chromosome 13 in retinoblastomas. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:7391-7394.
- Dryja, T; Mukai, S; Petersen, R; Rapaport, J; Walton, D; Yandell, D. Parental origin of mutations of the retinoblastoma gene. (1989). *Nature.* 339:556-558.
- Dunn, J. M; Phillips, R. A; Zhu, X; Becker, A; Gallie, B. Mutations in the RB1 Gene and their effects on transcription. (1989). *Mol. Cell Biol.* 9: 4596-4604.
- Fajardo, A; Mendoza, H; Valdez, E; Mejía, M; Yamamoto, L; Mejía, A; Ayón, A; Bolea, V; Frías, G; Rivera, R; Aguilar, M; Farfán, M; González, P. Frecuencia de neoplasias malignas en niños atendidos en hospitales del Distrito Federal. Estudio Multicéntrico. (1996). *Bol Med Hosp Infant Mex.* 53:57-66.
- Feugeas, O; Gurieo, N; Babin-Boilletot, A; Marcellin, L; Simon, P; Babin, S; Thyss, A; Hofman, P; Terrier, P; Kalifa, C; Brunat-Mentigny, M; Patricot, L; Oberling, F. Loss of heterozygosity of the RB gene is a poor prognostic factor in patients with osteosarcoma. (1996). *J. Clin. Oncol.* 14:467-472.
- Friend, S; Bernards, R; Rogel, S; Weinberg, R; Rappaport, J; Albert, D; Dryja, T. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. (1986). *Nature.* 323:643-646.
- Friend, S; Horowitz, J; Gerber, M; Wang, X; Bogenmann, E; Li, F; Weinberg, R: Deletions of a DNA sequence in retinoblastomas and mesenchymal tumors: Organization of the sequence and its coded protein. (1987). *Proc Natl. Acad Sci. USA.* 84:9059-9063.
- Fukushima, Y; Kuroki, Y; Ito, T; Kondo, I; Nishigaki, Y. Familial retinoblastoma (mother and son) with 13q14 deletion. (1987). *Hum. Genet.* 77:104-107.
- Gallie, B. L; Squire, J.A; Goddard, A; Dunn, J, M; Canton, M; Hinton, D; Zhu, X; Phillips, R. Mechanism of Oncogenesis in Retinoblastoma. (1990). *Lab. Invest.* 62: 394-408.

- Geradts, J; Hu, S; Lincoln, C; Benedict, W; Xu, H. Aberrant RB gene expression in routinely processed, archival tumor tissues determined by three different anti-RB antibodies. (1994). *Int. J. Cancer.* 58:161-167.
- Goodrich, D; Lee, W. Molecular characterization of the retinoblastoma susceptibility gene. (1993). *B. B. Acta.* 1155: 43-61.
- Graña, X; Reddy, E. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDK's), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKI's). (1995). *Oncogene.* 11:211-219.
- Greger, V; Debus, N; Lohmann, D; Höpping, W; Passarge, E; Horsthemke, B. Frequency and parental origin of hypermethylated RB1 alleles in Rb. (1994). *Hum. Genet.* 94:491-496.
- Guízar-Vázquez. J. 1994. *Genética Clínica. Diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias.* Ed. Manual Moderno, 2a ed. p. 830.
- Haas-Kogan, D; Kogan, S; Levi, D; Dazin, P; T'Ang, A; Fung, Y; Israel, M. Inhibition of apoptosis by the retinoblastoma gene product. (1995). *EMBO J.* 14:461-472.
- Hamel, P; Gallie, B; Phillips, R. The retinoblastoma protein and cell cycle regulation. (1992). *TIG* 8: 180-185.
- Harbour, W; Lai, S; Whang-Peng, J; Gazdar, A; Minna, J; Kaye, F. Abnormalities in Structure and Expression of the Human Retinoblastoma gene in SCLC. (1988). *Science.* 241:353.357.
- Harnden, D. G. A human skin culture technique used for cytological examination. (1960). *Brit. J. Exp. Rath.* 41:31.
- Hensel, C; Hsieh, C; Gazdar, A; Johnson, B; Sakaguchi, A; Naylor, S; Lee, W; Lee, E. Altered Structure and expression of the human Retinoblastoma susceptibility gene in Small Cell Lung Cancer. (1990). *Cancer Res.* 50: 3067-3072.
- Hoog, A; Bia, B; Onadim, Z; Cowell, J; Molecular mechanisms of oncogenic mutation in tumors from patients with bilateral and unilateral retinoblastoma. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:7351-7355.
- Horowitz, J; Yandell, D; Park, S; Canning, S; Whyte, P; Buchkovich, K; Harlow, E; Weinberg, R; Dryja, T. Point mutational inactivation of the retinoblastoma antioncogene. (1989). *Science.* 243:937-940.
- Horowitz, J. Park, S; Bogenmann, E; Cheng, J; Yandell, D; Kaye, F; Minna, J; Dryja, T; Weinberg, R. Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene in restricted to a subset of human tumor cells. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:2775-2779.

- Horsthemke, B; Barnert, H; Greger, V; Passarge, E; Hopping, W. Early diagnosis in hereditary Retinoblastoma by detection of molecular deletions at gene locus. (1987). *Lancet*, 28: 511-512.
- Huebner, R; Todaro, G. Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. (1969). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 64: 1087.
- Hung, F; Huang, H; To, H; Young, L; Oro, A; Bookstein, R; Lee, E; Lee, W. Structure of the human retinoblastoma gene. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86:5502-5506.
- Huang, P. Protein Domains governing interactions between E2F, the retinoblastoma gene product and Human Papillomavirus type 16E7 protein. (1993). *Mol. Cell Biol*. 13:953-960.
- Ikeda, A; Jakoi, L; Nevins, J. A unique role for the Rb protein in controlling E2F accumulation during cell growth and differentiation. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93:3215-3220.
- Inazawa, J; Ariyana, T; Tokino, T; Tanigami, A; Nakamura, Y; Abe, T. High resolution ordering of DNA markers by multi-colors fluorescen in situ hybridization of prophase chromosomes. (1994). *Cytogen Cell Genet*. 65:130.135.
- Innis, M; Snisky, G. 1990. PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic Press Inc.
- ISCN. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, 1995.
- Janson, M; Nordenskjöld, M. A constitutional mutation within the retinoblastoma gene detected by PFGE. (1994). *Clin. Genet*. 45:5-10.
- Kaelin, W; Pallas, D; DeCarpio, J; Kaye, F; Livingston, D. Identification of cellular proteins that can interact specifically with the T/E1A binding region of the Rb gene product. (1991). *Cell*. 64:521-532.
- Kato, M; Ishizaki, K; Shimizu, T; Ejima, Y; Tanooko, H; Takayama, J; Kaneko, A; Toguchida, J; Sasaki, M. Parental origin of germ-line and somatic mutations in the retinoblastoma gene. (1994). *Hum. Genet*. 94:31-38.
- Kempter, K. Quick preparation of high molecular wight DNA by freezing. (1992). *TIG*. 8:226-227.
- Knudsen, E; Wang, J. Differential regulation of retinoblastoma protein function by specific Cdk phosphorylation sites.(1996). *J. Biol. Chem*. 271:8313-8320.

- Knudson, A. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. (1971). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 68: 820-823.
- Knudson, A; Meadows, A; Nichols, W; Hill, R. Chromosomal Deletion and Retinoblastoma. (1976). New. Eng. J. Med. 11: 1120-1123.
- Knudson, A. Genetics of Human Cancer. (1986). Ann. Rev. Genet. 20: 231-251.
- Knudson, A. Antioncogenes and human cancer. (1993). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90:10914-10921.
- Kodama, R; Eguchi, G. Gene regulation and differentiation in vertebrate ocular tissues. (1994). Curr. Op. Gen. Dev. 4:703-708.
- Kondo, I; Shin, K; Honmura, S; Nakajima, H; Yamamura, E; Satoh, H; Terauchi, M; Usuki, Y; Takita, H; Hamaguchi, H. A case report of a patient with retinoblastoma and chromosome 13q deletion: assignment of a new gene (gene for LCPI) on human chromosome 13. (1985). Hum. Genet. 71:263-266.
- Kyritsis, A; Tsukos, M; Triche, T; Chader, G. Retinoblastoma-origin from a primitive neuroectodermal cell? (1984). Nature. 307:471-473.
- Lee, W; Bookstein, R; Hong, F; Young, L; Schew, J; Lee, F. Human Retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification and secuence. (1987). Science 235: 1394-1399.
- Lee, W. H. Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers. (1988). Science. 241:218-221.
- Lee, E.Y; Hu, N; Yuan, S.F; Cox, L.A; Bradley, A; Lee, W.H; Herrup, K. Dual roles of the retinoblastoma protein in cell cycle regulation and neuron differentiation. (1994). Genes & Dev. 8:2008-2021.
- Lemieux, N; Malfoy, B; Fetni, R; Muleris, M; Vogt, N; Richer, C; Dutrillaux, B: In situ hybridization approach at infragenic level on metaphase chromosomes. (1994). Cytogenet Cell Genet. 66:107-112.
- Levine, A. J. 1992. Tumor supressor genes, the cell cycle and cancer. Vol. 12. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 260 p.
- Lohmann, D; Horsthemke, B; Gillessen-Kaesbach, G; Stefani, F; Hofler, H. Detection of small RB1 gene deletions in retinoblastoma by multiplex PCR and high resolution gel electrophoresis. (1992). Hum. Genet. 89: 49-53.
- Lohmann, D; Brandt, B; Höpping, W; Passarge, E; Horsthemke, B: The spectrum of RB1 germline mutations in hereditary retinoblastoma. (1996). Am. J. Hum Genet. 58:940-949.

- McGee, T; Yandell, D; Dryja, T. Structure and partial genomic sequence of the human retinoblastoma susceptibility gene. (1989). *Gene*. 80:119-128.
- Michalová, K; Kloucek, F; Musilová, J. Deletion of 13q in two patients with retinoblastoma, one probably due 13q- mosaicism in the mother. (1982). *Hum. Genet.* 61:264-266.
- Mittnacht, S; Lees, J; Desai, D; Harlow, E; Morgan, D; Weinberg, R; Distinct subpopulations of the retinoblastoma protein show a distinct pattern of phosphorylation. (1994). *EMBO J*: 13:118-127.
- Molnar, M; Stefansson, K; Marton, L; Tripathi, R; Molnar, G. Immunohistochemistry of retinoblastomas in humans. (1984). *Am. J. Ophthalmol.* 97:301-307.
- Motegi, T. Lymphocyte chromosome survey in 42 patients with retinoblastoma: effort to detect 13q14 deletion mosaicism. (1981). *Hum. Genet.* 58:168-173.
- Motegi, T. High Rate of Detection of 13q14 Deletion Mosaicism Among Retinoblastoma patients (Using more extensive methods). (1982). *Hum. Genet.* 61: 95-97
- Motegi, T; Komatsu, M; Minoda, K. Is the Interstitial Deletion of 13q in Retinoblastoma Patients not transmissible? (1983). *Hum. Genet.* 64: 205
- Mudrak, I; Ogris, E; Rotheneder; Wintersberger, E. Coordinated trans activation of DNA synthesis-and precursor-producing enzymes by Polyomavirus Large T Antigen through interaction with the retinoblastoma protein. (1994). *Mol. Cell Biol.* 14:1886-1892.
- Mukai, S; Rapaport, J; Shields, J; Augsburger, J; Dryja, T. Linkage of genes for human esterase D and hereditary Retinoblastoma. (1984). *Am. J. Ophthalmol.* 97: 681-685.
- Muller, H; Scott, R. Hereditary conditions in which the loss of heterozygosity may be important. (1992). *Mutation Res.* 284: 15-24.
- Munier, F; Arabien, L; Flodman, P; Spence, A; Pescia, G; Rutz, P; Murphree, L. Putative non-Mendelian transmission of retinoblastoma in males: a phenotypic segregation analysis of 150 pedigrees. (1994). *Hum Genet.* 94: 484-490.
- Murphree, A; Benedict, W. Retinoblastoma: Clues to human oncogenesis. (1984). *Science.* 223: 1028.
- Nakamura, Y; Leppert, M; O'Connell, P; Wolff, R; Holm, T; Culver, M; Martin, C; Fujimoto, E; Hoff, M; Kumlin, E; White, R. Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) Markers for Human Gene Mapping. (1987). *Science.* 235: 1616-1622.

- Naumova, A; Sapienza, C. The genetics of retinoblastoma. Revisited. (1994). *Am. J. Hum. Genet.* 54:264-273.
- Nevins, J. E2F: A link between the RB tumor suppressor protein and viral oncoproteins. (1992). *Science.* 258:424-428.
- Ohtani-Fujita, N; Fujita, T; Aoike, A; Osifchin, N; Robbins, P; Sakai, T. CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene. (1993). *Oncogene.* 8:1063-1067.
- Ohtani-Fujita, N; Fujita, T; Takahashi, R; Robbins, P; Dryja, T; Sakai, T: A silencer element in the retinoblastoma tumor-suppressor gene. (1994). *Oncogene.* 9:1703-1711.
- Onadim, Z; Hogg, A; Cowell, J. Mechanisms of oncogenesis in patients with familial retinoblastoma. (1993). *Br. J. Cancer.* 68:958-964.
- Pellestor, F; Lefort, G; Charlieu, A. Use of the primed in situ labeling (PRINS) technique for a rapid detection of chromosomes 13, 16, 18, 21 X and Y. (1995). *Hum. Genet.* 95:12-17.
- Popoff, N; Ellsworth, R. The fine structure of retinoblastoma. (1971). *Lab. Invest.* 25:389-402.
- PROMEGA. Catalogo 1994-1995. Pag. 93.
- Qin, X; Livingston, D; Kaelin, W; Adams, P. Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53 mediated apoptosis. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 10918-10922.
- Ram, S; Babu, A. 1994. *Human Chromosomes. Principles and techniques.* Ed. McGrawHill.
- Richardson, V; Littlefield, L; Sayer, A; Peterson, D. Cell-cycle-stage specificity of methotrexate block as resolved by X-ray-induced chromosome damage. (1994). *Cytogenet Cell Genet.* 66:126-128.
- Riley, D; Lee, E; Lee, W; The retinoblastoma protein: More Than a Tumor Suppressor. (1994). *Annu. Rev. Cell Biol.* 10:1-29.
- Rivera, H; Turleau, C; Grouchy, J; Junien, C; Despoisse, S; Zucker, J: Retinoblastoma-del(13q14): Report of Two Patients, One with a Trisomic Sib Due to Maternal Insertion. Gene-Dosage Effect for Esterase D. (1981). *Hum. Genet.* 59:211-214.
- Rooney, D; Czapulkowski, B. 1986. *Human cytogenetics.* IRL Press, Oxford. p. 241.
- Saenz-Santamaría; McNutt, Shea. Immunohistochemical expression of retinoblastoma protein in cutaneous melanomas. (1995). *Br. J. Dermat.* 133:890-895.

- Saiki, R; Gelfand, H; Stoffel, S; Scharf, S; Higuchi, R; Horn, G; Mullis, K. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. (1988). *Science*. 239:487-491.
- Sakai, T; Ohtani-Fujita, N; McGee, T; Robbins, P; Dryja, T. Oncogenic germ-line mutations in Sp1 and ATF sites in the human retinoblastoma gene. (1991). *Nature*. 353: 83-86.
- Salamanca, F; Luengas, F; Antillón, F. Genetic and cytogenetic studies in children with retinoblastoma. (1984). *Cancer Genet. Cytogenet.* 83:129-138.
- Salamanca, F. 1992. *Citogenética Humana: Fundamentos y aplicaciones Clínicas*. Ed. Médica Panamericana.
- Salcedo, M; Taja, L; Utrera, R; Chávez, P; Bonilla, M.A; Cruz F; Aranda, C; López, O; Benítez, L. Heterogeneity of Rb expression in uterin cervic neoplastic lesions. (1996). Enviado.
- Sambrook, J; Maniatis, T; Fritsch, E; 1990. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. p.545.
- Scharf, S; Bowcock, A; McClure, G; Klitz, W; Yandell, D; Erlich, H. Amplification and Characterization of the Retinoblastoma Gene VNTR by PCR. (1992). *Am. J. Hum. Genet.* 50: 371-381.
- Scriver, C; Beaudet, A; Sly, W; Valle, D. 1995. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Vol I. 17a. ed. Ed. Mc Graw Hill.
- Seabright, M. A rapid banding technique for human chromosomes. (1971). *Lancet*. 2: 971
- Shields, J. 1992. *Intraocular tumors. A text and Atlas*. W.B. Saunders Company p. 577.
- Shiio, Y; Yamamoto, T; Yamaguchi, N. Negative regulation of Rb expression by the p53 gene product. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89: 5206-5210.
- Shizuo, M; Joyce, M; Rapaport, M; Jerry, A; James, J; Augsburger, Thaddeus, D. Linkage of genes for human esterase D and hereditary retinoblastoma. (1984). *Am. J. Ophthalmol.* 97: 681-685.
- Slack, R.S; Hamel, P.A; Bladon, T.S; Gill, R.M; McBurney. Regulated expression of the retinoblastoma gene in differentiatin embryonal carcinoma cells. (1993). *Oncogene*. 8:1585-1591.

- Smith, M; Zhan, Q; Bae, Y; Fornace, A: Role of Rb gene product in p53 mediated DNA damage response. (1994). *Exp. Cell Res.* 215: 386-389.
- Sorsby, A. Bilateral Retinoblastoma: A Dominantly Inherited Affection. (1972). *Brit. Med. J.* 2: 580-583.
- Southern, E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. (1975). *J. Moll. Biol.* 28: 503.
- Sparkes, R; Sparkes, M; Wilson, M; Towner, J; Benedict, W; Murphree, L; Yunis, J. Regional Assignment of genes for human esterase D and retinoblastoma to chromosome band 13q14. (1980). *Science.* 208: 1042-1044.
- Sparkes, R; Murphree, A; Lingua, R; Sparkes, M; Leigh, L; Funderburk, S; Benedict, W. Gene for hereditary retinoblastoma assigned to Human chromosome 13 by linkage to esterase D. (1983). *Science.* 219:971-973.
- Stahl, A; Levy, N; Wadzynska, T; Sussan, J; Jourdan-Fonta, D; Saracco, J. The genetics of retinoblastoma. (1994). *Ann Génét.* 37:172-178.
- Stanley, S. 1976. *Lynch's Medical Laboratory.* W.B. Saunders Co. Vol II. 3a ed. p. 1485.
- Stephen, J. 1980. *Enfermedades de los ojos.* Ed. Interamericana 16a ed. p.550 .
- Stokke, T; Erikstein, B; Smedshammer, L; Boye, E; Steen, H. The Retinoblastoma Gene Product Is Bound in the Nucleus in Early G1 Phase. (1993). *Exp. Cell. Res.* 201: 147-155
- Strong, L; Riccardi, V; Ferrell, R; Sparkes, R. Familiar Retinoblastoma and Chromosome 13 Deletion Transmitted via an Insertional Translocation. (1981). *Science* 213: 1501-1503.
- Takashi, S; Toguchida, J; Kato, M; Kaneko, A; Ishizaki, K; Sasaki, M. Detection of mutations of the RB1 gene in retinoblastoma patients by using exon by exon PCR-SSCP analysis. (1994). *Am. J. Hum. Genet.* 54:793-800.
- T'Ang, A; Varley, J; Chakraborty, S; Murphree, L; Fung, Y. Structural Rearrangement of the Retinoblastoma gene in Human Breast Carcinoma. (1988). *Science.* 242:263-266.
- Thompson, W. 1966. *Selected Histochemical and Histopathological methods.* Thomas Publisher, USA. p. 1639.
- Toguchida, J; Ishizaki, K; Sasaki, M; Hakamura, Y; Ikenaga, M; Kato, M; Sugimot, M; Kotoura, Y; Yamamuro, T. Preferential mutation of paternally derived RB gene as the initial event in sporadic osteosarcoma. (1989). *Nature.* 338:156-159.

- Tortora, G; Anagnostakos, N. 1989. Principios de Anatomía y Fisiología. Ed. Harla 5a. ed. p.993
- Ts'o, M; Zimmerman, L; Fine, B. The nature of retinoblastoma. I: Photoreceptor differentiation a clinical and histopathologic study. (1970). Am. J. Ophthalmol. 69:339-349.
- T'so, M; 1989. Retinal diseases. Ed. Lippincot Company. p. 134.
- Vaughan, D; Asbury, T. 1986. Oftalmología general. Ed. El Manual Moderno 8a. ed. p. 415.
- Venkateswara, R; Potluri, P; Helson, L; Robert, M; Ellsworth, M; Reid, T; Gilbert, F. Chromosomal Abnormalities in Human Retinoblastoma. (1986). Cancer. 58: 663-671.
- Viegas Pequignot, E; Dutrillaux, B. Une methode simple pour obtenir des prophase et des prometaphases. (1978) Ann. Génét. 21:122.
- Vogel, F. Genetics of Retinoblastoma (1979). Hum. Genet. 52: 1-14.
- Weinberg, R. The Retinoblastoma Gene and Gene Product in Cancer Surveys. 1992. Vol. 12: Tumor Suppressor Genes, the Cell Cycle and Cancer. Imperial Cancer Research Fund.
- Weinberg, R. The retinoblastoma protein and cell cycle control. (1995). Cell. 81:323-330.
- Welch, P; Wang, J. Disruption of retinoblastoma protein function by coexpression of its C-pocket fragment. (1995). Genes & Dev. 9:31-46.
- Wiggs, J; Nordenskjold, M; Yandell, D; et al. Prediction of the risk of Hereditary Retinoblastoma, Using DNA Polymorphisms within the Retinoblastoma gene. (1988). New. Engl. J. Med. 318: 151-157.
- Wilcox, J. Fundamental Principles of In Situ Hybridization. (1993). J. Histochem. Cytochem. 41: 1725-1733.
- Wilson, W; Campochiaro, P; Conway, B; Carter, B; Sudduth, K; Watson, B; Sparkes, R. Deletion (13)(q14.1q14.3) in two generations: variability of ocular manifestations and definition of the phenotype. (1987). Am. J. Med. Genet. 28:675-679.
- Williams, B; Schmitt, E; Remington, L; Bronson, R; Albert, D; Weinberg, R; Jacks, T. Extensive contribution of Rb-deficient cells to adult chimeric mice with limited histopathological consequences. (1994). EMBO J. 13:4251-4259.
- Xu, H; Hu, S; Cagle, P; Moore, G; Benedict, W. Absence of retinoblastoma protein expression in primary Non-Small Cell Lung Carcinomas. (1991). Cancer Res. 51:2735-2739.

- Yandell, D; Dryja, T. Detection of DNA Sequence Polymorphisms within the Retinoblastoma gene. (1988). *New. Engl. J. Med.* 318: 151-157.
- Yandell, D; Dryja, T. Detection of DNA Sequence Polymorphisms by Enzymatic Amplification and Direct Genomic Sequencing. (1989). *Am. J. Hum. Genet.* 45:547-555.
- Yi, Y; Yang, W; Zhen, H. Retinoblastoma:cell origin and differentiation. (1994). *Chung-Hua-Yen-Ko-Tsa-Chih.* 30: 214-217.
- Yoo, G; Xu, H; Brennan,J; Westra, W; Hruban, R; Koch, W; Benedict, W; Sindransay, D. Infrequent inactivation of the retinoblastoma gene despite frequen loss of chromosome 13q in head and neck squamous cell carcinoma. (1994). *Cancer. Res.* 54:4603-4606.
- Yuge, K; Nakajima, M; Uemura, Y; Miki, H; Uyama, M; Tsubura, A. Immunohistochemical features of the human retina and retinoblastoma. (1995). *Virchows Arch.* 426:571-575.
- Yunis, J. High resolution of human chromosomes. (1976). *Science.* 191:1268-1270
- Yunis, J; Ramsay, N. Retinoblastoma and Subband Deletion of Chromosome 13. (1978). *Am. J. Dis. Child.* 132: 161-163.
- Zacksenhaus, E; Bremner, R; Jiang, Z; Gill, M; Muncaster, M; Sopta, M; Phillips, R; Gallie, B. Unraveling the function of the Retinoblastoma Gene. (1993). *Adv. Cancer Res.* 61:51-75.
- Zavala, C. Comunicación personal.
- Zhang, X; Xu, T; Murakami, Y; Sachse, R; Yashima, K; Hirohashi, S; Hu, S; Benedict, W; Sekiya, T. Deletions of Chromosome 13q, mutations in retinoblastoma 1 and retinoblastoma protein state in Human Hepatocellular carcinoma. (1994). *Cancer Res.* 54:4177-4182.
- Zhu, X; Dunn, J; Phillips, R; Goddard, A; Paton, K; Becker, A; Gallie, B. Preferential germline mutation of the paternal allele in retinoblastoma. (1989). *Nature* 340: 312-313.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA