

00346



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DETECCION DE MUTACIONES EN EL GEN RB1 EN PACIENTES CON RETINOBLASTOMA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE: MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR) PRESENTA: Q.B.P. MARICELA RODRIGUEZ CRUZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. FABIO ABDEL SALAMANCA GOMEZ
CO-DIRECTOR: DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA

2000



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.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN GENETICA HUMANA, HOSPITAL DE PEDIATRIA, CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS, BAJO LA DIRECCION DEL DR DIEGO ARENAS A., DR FABIO SALAMANCA G. Y DR MAURICIO SALCEDO V

DEDICATORIA A

DIOS

MI MADRE

ANGELES

ARIADNA

MI ABUELA

FERNANDO

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Fabio A. Salamanca por permitirme pertenecer a su grupo y poder realizar el trabajo de investigación

Al Dr. Diego Arenas por su gran calidad humana y disponibilidad para transmitir sus conocimientos, gracias por tu AMISTAD.

A Dr. Mauricio Salcedo por su incondicional apoyo, acertados comentarios y apoyo profesional.

A mis grandes amigos que compartieron conmigo un poco de su vida: Arely, Ana Claudia, Samuel, Irma, Selene, Lolita, Juan Carlos.

A todos mis compañeros de Biología Molecular por compartir su alegría realmente hicieron muy agradable mi estancia en el laboratorio. Rosenda, Paul, Eiena, Xochitl, Rafael, Tony, Miguel, Carolina.

A la Dra. del Prado por permitirme robarle "tiempo" al tiempo y poder terminar más rápido este trabajo

A Marna Gonzalez H. por ser tan amable en heredarme algunas de sus muestras y por ser una noble persona.

A la Dra. Georgina del servicio de patología por su amabilidad y proporcionarme los tumores de los pacientes

A la Dra. Sara Frías por su valiosa aportación en la revisión de la tesis

A la M. en C. Mansol López L., Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt B., Dr. Mauricio Salcedo V., Dra. Sara Frías, Dr. Diego Arenas A., Fabio A. Salamanca G. y Dr. Ramón Coral V., por los acertados comentarios en la revisión del presente trabajo.

## INDICE

RESUMEN	I
<b>I INTRODUCCION</b>	
A. Transmisión genética del retinoblastoma	3
B. Signos y síntomas del retinoblastoma	4
C. Origen genético del retinoblastoma	4
D. La citogenética del retinoblastoma	5
E. Mecanismos genéticos que generan pérdida de heterocigosidad	7
F. Caracterización estructural del gen Rb1	8
G. Anormalidades genéticas en tumores de retinoblastoma	9
H. Estudios moleculares del gen RB1	12
I. La proteína pRb producto del gen Rb1	14
J. Familia de proteínas de retinoblastoma	21
K. Genes supresores de tumor en otras enfermedades malignas	23
L. Hipótesis molecular para la patogénesis del retinoma y la baja penetrancia de la mutación del gen Rb1 en algunas familias	24
<b>II HIPOTESIS</b>	<b>28</b>
<b>III JUSTIFICACION</b>	<b>28</b>
<b>IV OBJETIVOS</b>	<b>29</b>

## V SUJETOS Y METODOS

A. Pacientes	31
B. Citogenética	31
C. Aislamiento del DNA genómico humano a partir de leucocitos de sangre periférica	32
D. Aislamiento de DNA genómico humano a partir de tumor de retinoblastoma embebido en bloques de parafina	33
E. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de 6 regiones del gen Rb1	34
F. Detección de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSC)	36
G. Secuenciación del DNA	38
H. Inmunohistoquímica de la proteína pRb en retinoblastoma	41

## VI. RESULTADOS

A. Estudio citogenético	44
B. Estudio molecular	50
C. Análisis inmunohistoquímico para la proteína pRb en retinoblastomas	65

## VII. DISCUSION

A. Análisis genético y citogenético	75
B. Análisis molecular	80
C. Análisis inmunohistoquímico	89

VIII. CONCLUSIONES	93
--------------------	----

IX. BIBLIOGRAFIA	94
------------------	----

## RESUMEN

El retinoblastoma es una neoplasia embrionaria que se manifiesta en dos formas: la forma esporádica (no heredada) y la forma familiar (heredada). En los casos esporádicos, el tumor es unilateral y en la forma familiar puede ser tanto bilateral como unilateral. Tiene una incidencia de 1 en 13,500- 25,000 nacidos vivos, presentando signos y síntomas que incluye leucocoria, estrabismo, midriasis unilateral y heterocromia. El gen que predispone al desarrollo de retinoblastoma es Rb1 y se localiza en el cromosoma 13 en la región 13q14.1. El gen Rb1 está formado por 27 exones que codifican para una fosfoproteína nuclear que participa de manera importante en la regulación del ciclo celular. De acuerdo a la hipótesis de Knudson, se deben presentar dos mutaciones en el gen Rb1 para que se desarrolle la neoplasia. Las mutaciones puntuales son el tipo de mutaciones más frecuentes que se presentan en el gen Rb1 que generan el desarrollo de retinoblastoma.

En este trabajo se analizó el patrón de distribución de mutaciones en 19 enfermos de retinoblastoma unilateral o bilateral, utilizando las técnicas: co-amplificación por PCR (amplificación en cadena de la polimerasa) no isotópico, polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP) mediante PCR-isotópico y secuenciación de exones que mostraron algún polimorfismo. Además se realizó el estudio citogenético para determinar si existían alteraciones cromosómicas en estos individuos y también se analizó la presencia o ausencia de la proteína pRb en tumores de estos pacientes.

El estudio citogenético mostró alteraciones cromosómicas en uno de los individuos. El análisis molecular mediante SSCP-isotópico, mostró polimorfismo en el DNA de tres individuos y al secuenciar estas regiones se identificaron mutaciones puntuales en los tres casos.

En uno de los pacientes se identificaron dos mutaciones una en el exón 8 y otra en el exón 20, solo una de éstas generó un codón de paro lo que se traduce en una proteína pRb truncada. Esto fue confirmado ya que en el análisis inmunohistoquímico del tumor de este paciente no se identificó la proteína pRb. Debido a que este paciente presentó retinoblastoma bilateral se puede decir que alguna de las dos mutaciones viene segregando por línea germinal (mutación precigótica) o que se generó en las etapas tempranas del desarrollo embrionario.

En el paciente en donde se identificó una mutación de tipo puntual en el exón 18, se generó un codón de paro y no fue posible realizar el análisis inmunohistoquímico debido a

que no hubo enucleación de la pieza ocular. En este caso el paciente presentó retinoblastoma unilateral.

La tercera mutación puntual identificada fue en el exón 20 en el DNA constitucional, esta mutación también generó un codón de paro. De acuerdo a esto se puede sugerir que el retinoblastoma unilateral que presentó el paciente pertenece a la forma familiar ya que la primera mutación constitucional pudo haberse generado durante el desarrollo embrionario o segregarse por vía germinal.

En todos los tejidos analizados, con excepción del paciente 2-Rb, se observó que la proteína pRb estaba presente en el tejido. Esto no indica que la proteína pRb sea funcional ya que el anticuerpo que se utilizó para identificar a pRb está dirigido contra el carboxilo terminal, de manera que no determina su estado de fosforilación.

En conclusión, debido a la severidad de esta neoplasia y las consecuencias que ésta tiene es importante identificar el tipo de mutaciones que se presentan en los individuos con retinoblastoma, de manera que permita hacer un seguimiento en sus familiares en edad pediátrica que requieren vigilancia clínica debido al riesgo que tienen de desarrollar esta neoplasia.

## I. INTRODUCCION

El cáncer ha sido una enfermedad mortal durante la historia de la humanidad y su prevalencia ha cambiado con el avance industrial y tecnológico ya que se ha convertido en una enfermedad común afectando uno de cada tres individuos (*Weinberg A R, 1996*) En México desde 1990 los tumores malignos representan la segunda causa de muerte en la población en general después de las enfermedades cardiovasculares (*Mohar A, 1997*)

### Etiología y patogenia del Cáncer

La carcinogénesis involucra una serie de cambios dentro de las células que generalmente ocurren a través del curso de muchos años, que puede ser desde una década o más entre el inicio de la carcinogénesis y el diagnóstico de la neoplasia, haciendo difícil puntualizar la causa de ésta. En muchos casos, las causas de cáncer no están definidas claramente pero se sabe que tanto factores; externos (humo de cigarro, alcohol, tipo de dieta, químicos industriales, herbicidas, aire, agua contaminada, drogas, infecciones, luz solar, exposición a radiación, etc) como internos (defectos en el sistema inmune, factores genéticos) juegan un papel muy importante para iniciar y promover la carcinogénesis (*Hooper M L, 1999, Weinberg A R, 1996*).

En la actualidad no se tiene información detallada de como la mayoría de las exposiciones a los carcinógenos dan origen al cáncer, se cree que éste surge de los efectos de dos tipos diferentes de carcinógenos; uno de estos comprende agentes que dañan genes involucrados en controlar la migración y proliferación celular. La neoplasia surge cuando una sola célula acumula cierto número de mutaciones, generalmente durante muchos años y finalmente escapa de los mecanismos que reprimen la proliferación, las mutaciones permiten a la célula y sus descendientes desarrollar alteraciones adicionales y acumularlas de manera que su número se incrementa favoreciendo la formación del tumor. Una teoría que ha permanecido por mucho tiempo sostiene que muchos agentes ambientales además de la edad y el tipo de vida, juegan un papel importante en el incremento de la producción en el cuerpo de radicales libres, éstos reaccionan con el DNA de algunos genes generando mutaciones. El otro tipo de carcinógenos incluye agentes que no dañan genes pero en su lugar aumentan selectivamente el crecimiento de células de tumor o sus precursores, entre éstos se conocen a los virus, que actúan generalmente acelerando la velocidad de la división celular. Los virus y otros agentes infecciosos contribuyen en un 5% de todos los casos de cáncer. Por supuesto, los genes heredados de los padres también influyen en el desarrollo del cáncer debido a que algunos individuos nacen con las mutaciones que promueven el crecimiento excesivo de ciertas células (*Tichopoulos D y col 1996*)

Debido a la producción de carcinógenos dentro del cuerpo y a los errores genéticos en la replicación, se cree que una cuarta parte de todos los cánceres se podrían desarrollar en un ambiente libre de influencias externas. En este proceso se presenta la pérdida del control de los mecanismos de replicación y reparación del DNA. La alta eficiencia del sistema de reparación es una razón de que puedan pasar muchas décadas antes de que se generen las mutaciones necesarias para el desarrollo de la neoplasia, aunque las células normales tienen estrategias de defensa contra el desarrollo del cáncer, las células tumorales activan diferentes vías de escape para favorecer su proliferación (*Weinberg A R., 1996*)

El estudio del ciclo celular y su regulación han permitido conocer como se mantiene la fidelidad e integridad de la replicación del genoma por las funciones coordinadas en los puntos de control y de los sistemas de reparación del DNA, sin embargo el funcionamiento adecuado de estos procesos se puede alterar por mutaciones génicas.

Como ya se mencionó anteriormente la transformación maligna de una célula surge a través de la acumulación de mutaciones en clases específicas de genes que proporcionan la clave para entender la raíz del proceso del cáncer humano. Existen dos clases de genes, que juntos constituyen una pequeña proporción de todo el grupo de éstos que participan de manera importante en el desarrollo del cáncer. En su función normal, estos genes regulan el ciclo celular, estas dos clases de genes son; 1) los protooncogenes que favorecen el crecimiento celular y 2) los genes supresores de tumor, que lo inhiben, de manera que el funcionamiento colectivo de estos genes explican mucho de la proliferación celular descontrolada en el cáncer. Cuando los protooncogenes están mutados, se convierten en oncogenes que dirigen la multiplicación celular excesiva, las mutaciones en los protooncogenes pueden generar que se aumente la producción de ciertas proteínas estimuladoras del crecimiento celular. En contraste, los genes supresores de tumor, contribuyen al cáncer cuando se inactivan por mutaciones y como resultado hay pérdida funcional de proteínas supresoras que privan a la célula de frenos importantes que evitan el crecimiento descontrolado (*Trichopoulos D., y col., 1996*).

#### *Inactivación de los genes supresores de tumor*

Para que una célula normal se convierta en maligna además de sobreestimar su maquinaria promotora de crecimiento, también deben tener vías para evadir o ignorar señales que detienen el ciclo celular que son emitidas por células normales adyacentes.

La lista de síndromes de cáncer familiar en los que están incluidos genes supresores de tumor esta creciendo, por ejemplo, las formas mutadas del gen supresor de tumor p53 producen tumores en múltiples sitios además del síndrome de Li-Fraumeni, los genes BRCA1 y BRCA2 recientemente aislados están asociados a cancer de mama hereditario, incluyendo el

20% de todos los cánceres de mama premenopáusicos. Otro gen supresor de tumor es Rb1 cuyas alteraciones conducen al desarrollo de cáncer intraocular conocido como retinoblastoma que afecta a niños que más tarde tienen el riesgo de desarrollar osteosarcoma (Trichopoulos D, y col, 1996)

## RETINOBLASTOMA

### A. Transmisión genética del retinoblastoma

Desde 1821 se han reportado casos de retinoblastoma dentro de una misma familia, el descubrimiento de casos familiares de retinoblastoma originó la hipótesis de que se puede heredar la susceptibilidad a la enfermedad (Goodrich D. W, 1993) El retinoblastoma ha servido como el ejemplo prototipo de la predisposición al cáncer, éste es un tumor maligno de la retina de localización intraocular, que afecta a niños pequeños, con una incidencia de 1 en 13,500 a 25,000 nacidos vivos. Esta neoplasia ocurre en dos formas: la forma esporádica (no heredada) y la forma familiar (heredada). En los casos esporádicos, el tumor es unilateral de manera unifocal, generalmente se presenta a los 2 años de edad y representa el 60% de todos los casos de retinoblastoma. Las formas hereditarias aparecen a una edad muy temprana (en ocasiones en recién nacidos), éstos representan el 40% de todos los casos de retinoblastoma, de éstos el 10% (unilaterales o bilaterales) son transmitidos de un padre afectado y el 30% restante podrían resultar de una mutación germinal *de novo* en alguno de los progenitores y se presenta de forma unilateral o bilateral. La enfermedad familiar se transmite como una enfermedad mendeliana autosómica dominante con penetrancia incompleta y expresividad variable (Stahl A y col, 1994; Scriver Ch y col, 1995)

La penetrancia del retinoblastoma heredado no es del 100% ya que no se manifiesta en todas las generaciones de familias afectadas. El modelo más simple para explicar este patrón de herencia es la susceptibilidad del retinoblastoma para segregarse como una enfermedad autosómica dominante con penetrancia alta (80-95%) pero incompleta. En los casos heredados sin antecedentes familiares de la neoplasia, se estima que el 10-12% de casos unilaterales y 100% de casos bilaterales transmiten la susceptibilidad de desarrollar retinoblastoma a su progenie, ya que se puede generar por mutación del gen Rb1 en las células germinales de los padres. Los casos de retinoblastoma esporádico (60%), surge *de novo* por mutación del gen Rb1 en células somáticas durante el desarrollo del ojo (Goodrich D W, 1993).

En cuanto a la histogénesis del retinoblastoma, estudios previos han atribuido el origen del tumor a células neuronales, gliales o células totipotenciales (*stem*) de la retina. Kyriakis y

col., (1984) utilizaron una línea celular de retinoblastoma, para identificar un marcador específico de células neuronales como la enolasa específica (NSE) y un marcador de astrocitos, como la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP), ésta es una glicoproteína asociada a mielina para identificar células de Müller en la retina. Los resultados sugieren que las células no diferenciadas contienen ambos marcadores (NSE y GFAP) mientras que las neuronas y las células gliales que se están diferenciando pierden gradualmente un marcador y expresan selectivamente el marcador que correlaciona con su morfología. Estos resultados sugieren que el retinoblastoma se origina de una célula neuroectodermal primitiva bipotencial (Kyritsis y col., 1984)

### **B. Signos y síntomas del retinoblastoma**

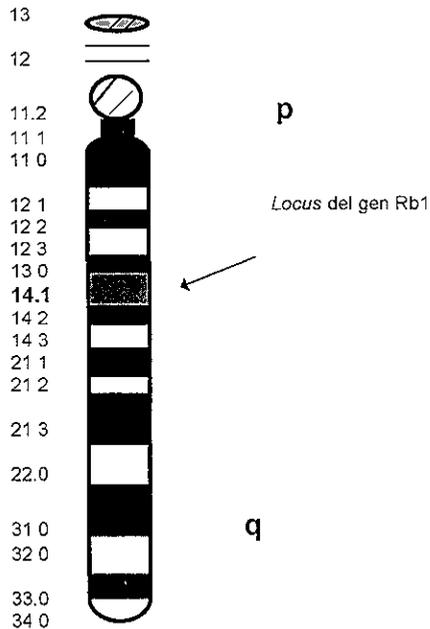
En la mayoría de los casos, el primer signo que presentan estos pacientes es el característico reflejo ojo de gato, este reflejo pupilar blanco, rosado o amarillo-blanco llamado leucocoria resulta del reemplazo del humor vítreo por el tumor o por crecimiento de éste en la mácula. Otro síntoma común es el estrabismo, que ocurre cuando pequeños tumores maculares interfieren con la visión o pueden estar asociados con leucocoria. También se presentan otros signos con menos frecuencia como ojos rojos con glaucoma secundario, celulitis orbital con visión disminuida, midriasis unilateral y heterocromía (Scriver Ch. y col., 1995).

### **C. Origen genético del retinoblastoma.**

En 1971 Knudson propuso la hipótesis que postula que dos mutaciones son responsables del desarrollo de retinoblastoma para cualquiera de las dos formas de la enfermedad, en la forma heredada, la primera mutación es germinal y se encuentra en todas las células del individuo, el gen Rb1 mutado se hereda de uno de los progenitores o la mutación se genera *de novo* en una célula germinal durante la gametogénesis de uno de los padres. El gen mutado localizado en el cromosoma 13q14.1 (Figura 1) es recesivo a nivel molecular, así la primera mutación constituye solamente una predisposición para desarrollar la neoplasia. La segunda mutación siempre es somática y afecta células de la retina que llevan la primera mutación en uno de los cromosomas, esto conduce a pérdida o inactivación del alelo normal de aquí la expresión frecuente de pérdida de heterocigosidad (LOH). Las células retinianas experimentan transformación maligna generando un tumor. En la forma esporádica del retinoblastoma, se cree que ambas mutaciones ocurren sucesivamente en una sola célula de la retina de manera que es muy raro que existan dos mutaciones idénticas en la misma célula, así que es poco probable que esto ocurra en ambos ojos esto explica porque la forma esporádica es unilateral (Knudson A. G., 1971)

#### **D. La citogenética del retinoblastoma.**

Yunis y Ramsay en 1978 demostraron la existencia de una deleción sobre el brazo largo del cromosoma 13, una banda localizada en 13q14.1 que frecuentemente se pierde en los casos de retinoblastoma. Cuando además de ésto, también ocurre otra alteración en el gen Rb1 del cromosoma homólogo, la deleción da como resultado el crecimiento de clonas de células tumorales debido a la pérdida del gen Rb1 que tiene una participación muy importante en la regulación del ciclo celular. Esta observación fué confirmada ya que el análisis citogenético demostró que la deleción de 13q14.1 se observa en el 5% de retinoblastomas, la pérdida de material estructural sobre el cromosoma 13 es solamente uno de los mecanismos que conducen a pérdida del gen Rb1, ya que las deleciones más pequeñas, no se detectan por métodos citogenéticos convencionales. Además el análisis cromosómico demostró que la eliminación de 13q14.1 ocurre no solo en células tumorales de la retina sino que también en células normales de niños que padecen de retinoblastoma familiar. En esas células solo uno de los cromosomas 13 muestra la deleción, la cual también se puede encontrar en células de los padres. En los casos esporádicos, la deleción solo se observa en las células del tumor (Yunis y Ramsay 1978, Stahl A y col, 1994)



### Cromosoma 13

Figura 1. Idiograma del cromosoma 13 en donde se muestra la región 13q14.1 que corresponde al locus del gen Rb1. Tomada de Verma R. S. y col., (1995)

Debido a que la pérdida constitucional de material genético del cromosoma 13q14.1 predispone a retinoblastoma, varios grupos de investigadores estudiaron los tumores de pacientes con cariotipo normal para determinar si las anomalías citogenéticas surgen como eventos somáticos. Aunque algunos reportes iniciales sugirieron que la banda 13q14 estaba deletada en una gran proporción de estos tumores, estudios posteriores demostraron que solo el 10% tienen monosomía de la región 13q14. Es importante considerar que en el retinoblastoma existen otras anomalías cromosómicas, las cuales parecen estar asociadas con el desarrollo del tumor más que con la iniciación del mismo, por ejemplo como en otros tipos de tumor, en retinoblastoma se observan copias extras del cromosoma 1q, isocromosoma 6p (1(6p)) que se ha encontrado en el 60% de los casos de Rb que da como resultado cuatro

dosis de todos los genes que se encuentran sobre el brazo corto del cromosoma 6 (*Gallie B L y col, 1990; Naumova A, y col, 1994, Scriver Ch y col, 1995*)

### **E. Mecanismos genéticos que generan pérdida de heterocigosidad (LOH).**

Existen varios eventos genéticos que pueden favorecer la expresión fenotípica del gen Rb1 mutado, en la forma familiar, la mutación del gen Rb1 es heredada y se encuentra en uno de los cromosomas 13 de todas las células cualquier evento genético que resulte en LOH, ya sea homocigosidad o hemicigosidad conduce a la aparición de una clona tumoral

Se han propuesto varios mecanismos cromosómicos que pueden conducir a la LOH.

- 1) No díscunción mitótica, con pérdida del cromosoma 13 normal, el cromosoma alterado será hemicigótico en todos sus genes, permitiendo la expresión del gen Rb1 mutado.
- 2) Pérdida del cromosoma 13 normal y no díscunción mitótica con duplicación del cromosoma 13 que tiene la mutación, dando como resultado homocigosidad para todos los genes.
- 3) Recombinación mitótica entre el cromosoma mutado y el normal con la posterior segregación, en donde se generan cromosomas que mantienen heterocigosidad en el *locus* próximos al centrómero, pero que muestra hemicigosidad en el resto del brazo largo del cromosoma incluyendo locus del gen Rb1.
- 4) Mutación del gen Rb1 en el alelo normal.
- 5) Se ha descrito otro mecanismo en mujeres afectadas por una translocación X-13, si el cromosoma 13 es translocado en el cromosoma X inactivo, la inactivación se puede continuar al segmento autosómico que tiene el gen Rb1 normal, este fenómeno constituye solo una predisposición a adquirir retinoblastoma ya que es necesaria la inactivación del alelo restante para que aparezca el tumor (*Nichols y col, 1980, Stahl A y col., 1994; Jones C. and col., 1997*).

Naumova y Sapienza (1994) propusieron la siguiente hipótesis respecto al fenómeno de impronta génica, esta hipótesis se basa en un estudio genético en pacientes con retinoblastoma. En este trabajo encontraron una desproporción de sexos, debido a que ésta involucra dos cromosomas diferentes (Y y 13 con la mutación en el gen Rb1), que ocurre entre la progenie de hombres con retinoblastoma bilateral esporádico, es probable que exista un proceso capaz de actuar en trans y dar sensibilidad al origen parental de los alelos, este proceso sería la impronta genómica. La hipótesis que proponen sugiere que los hombres con retinoblastoma bilateral esporádico, son portadores de un gen defectuoso de impronta en el cromosoma X, debido a esto son incapaces de borrar la impronta materna y/o reestablecer la impronta paterna en la porción del genoma heredado de sus madres, además tienen alterado el gen Rb1 en uno de sus cromosomas La descendencia de estos varones tendrá cuatro posibilidades, los dos embriones femeninos no sobrevivirán debido a que el padre afectado

transmite su cromosoma X (el cual tiene el gen defectuoso de impronta). Sólo serán viables aquellos que tengan un cromosoma Y y que además tienen un alelo Rb-1 alterado, lo cual se ve reflejado en la desproporción de sexos y el desarrollo de retinoblastoma en los varones (Naumova y Sapienza 1994)

### F. Caracterización estructural del gen Rb1.

El *locus* genético responsable para el desarrollo de retinoblastoma se llamó Rb1, el gen Rb1 se localizó por dos evidencias muy importantes. primero, en las deleciones constitucionales observadas en el cariotipo o las translocaciones que predisponían a Rb siempre estaba involucrada la banda 13q14 Segundo, el retinoblastoma familiar mostró estrecha relación con la actividad de esterasa D (ESD), la cual es un marcador polimórfico enzimático que se encuentra en sangre y su gen se localiza sobre el cromosoma 13q14, la proximidad del gen de la ESD y el gen Rb1 fue evidente debido a que los niveles sanguíneos de ESD se reducían al 50% cuando una deleción citogenética originaba retinoblastoma. Motegi y col., (1981 y 1982), (citado por Gallie B. L. y col., 1990) presentaron datos que mostraban que un pequeño porcentaje de pacientes con retinoblastoma heredado eran mosaico, ya que deleciones pequeñas en el cromosoma 13 detectadas con técnicas de bandeado cromosómico de alta resolución solo estaban presentes en una pequeña proporción de linfocitos de sangre periférica. Sin embargo como Motegi admitió, las técnicas citogenéticas no pueden ser lo suficientemente confiables para distinguir entre deleciones pequeñas y la presencia de artefactos como la compactación de bandas (Gallie B. L. y col., 1990).

La estrategia general empleada por varios grupos para lograr la caracterización del gen Rb1, fue aislar sondas de DNA localizadas en la región 13q14 para caminar sobre el cromosoma por tamizaje genético de genotecas de DNA y a intervalos periódicos se tamizaron genotecas de cDNA para detectar la expresión de genes. La clona de cDNA aislado se usó como sonda para determinar si la expresión del gen afin estaba ausente en el retinoblastoma, pero presente en células normales de la retina y en líneas celulares de tumores diferentes a retinoblastoma (Lee y col., 1987; Goodrich D W, 1993) La biología molecular permitió la identificación del gen Rb1, su tamaño es de 180,388 pb, con un marco de lectura abierto que va del nucleótido 140 del extremo 5'. Sin embargo existen dos codones potenciales de iniciación para la traducción, uno en el nucleótido 139 y otro en el nucleótido 475, la proteína consta de 928 aminoácidos con un peso molecular de 106 KD. El gen Rb1 consta de 27 exones, el tamaño de los intrones va de 80pb para el intrón 15 a aproximadamente 70 Kb para el intrón 17, el intervalo de los exones va de 31 nucleótidos para el exón 24 a 1889 para el exón 27, que contiene un codón de paro y las señales de poliadenilación El exón 1 contiene el

codón para la primer metionina y la secuencia 5' no traducida, la longitud del mRNA es de 4.7Kb (Goodrich y col., 1993) (Figura 2).

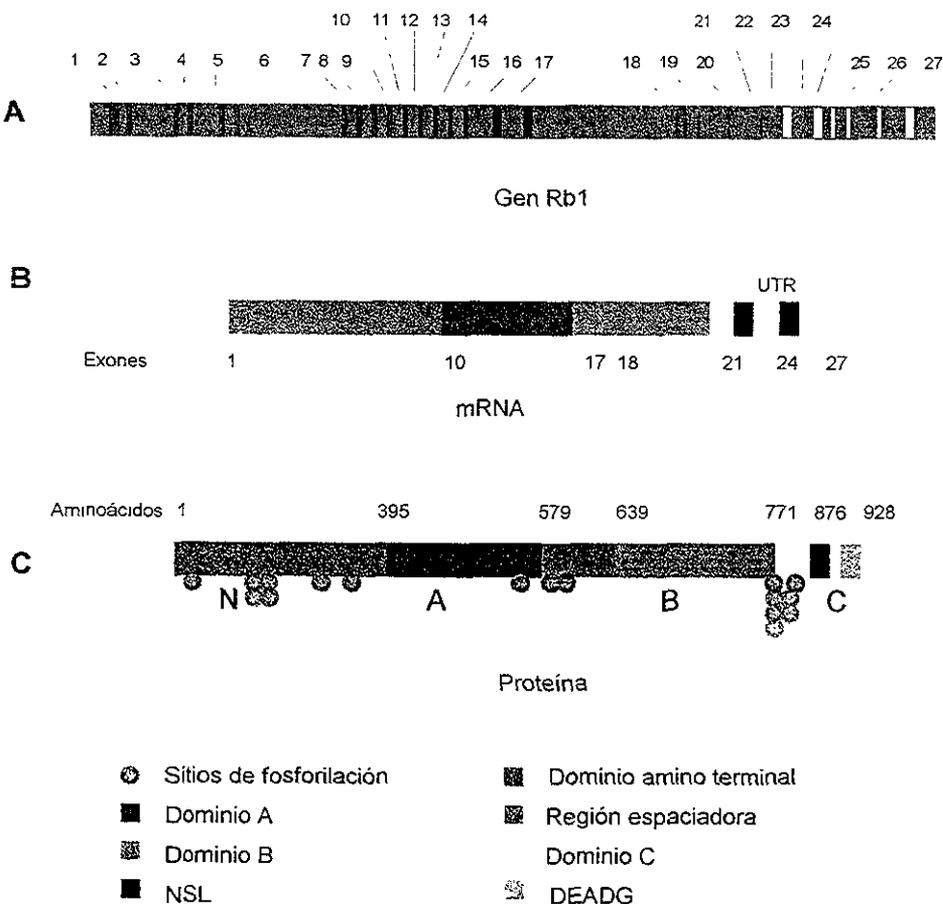
El análisis transcripcional del gen identificó tres sitios potenciales de iniciación en las posiciones nucleotídicas +1, +44 y +51, el análisis de eliminación de la secuencia 5' del gen Rb1 indicó que la región entre los nucleótidos -154 y +186 posee función promotora, con una subregión crítica de iniciación en los nucleótidos +13 y +183 (Scriver Ch y col., 1995)

### **G. Anormalidades genéticas en tumores de retinoblastoma.**

Los cambios somáticos del cromosoma 13 que no son detectados por análisis citogenético en tumores de retinoblastoma, se observaron comparando las isoenzimas ESD (esterasa D) en tumores y células constitucionales de pacientes heterocigotos para los alelos de la esterasa D. En el 70% de los tumores no se detectó un alelo de la ESD, indicando que esa "inactivación somática" ocurrió cerca del gen Rb1 en el cromosoma 13q14. La utilización de marcadores de DNA para fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) para el brazo largo del cromosoma 13 mostró que los cambios genéticos de la ESD se debieron a pérdida o rearrreglos cromosómicos. El análisis de hibridaciones tipo Southern blot con sondas para RFLP's (*Restriction Fragment length polymorphism*) en las células constitucionales, mostraron pérdida de heterocigosidad (LOH) en extensas regiones del brazo largo del cromosoma 13 en células tumorales (Cavenee y col., 1983) Existen varias sondas para detectar RFLP's dentro del gen Rb1 que pueden usarse para predecir mediante ligamiento, cuales miembros de una familia con retinoblastoma heredado tienen mayor probabilidad de heredar el cromosoma 13 mutado, sin embargo, solo el 10% de los pacientes tienen una historia familiar que permite hacer el ligamiento de la mutación en el gen Rb1. Si el tumor del retinoblastoma está disponible, se puede identificar el cromosoma mutado por la LOH que ocurre en el 70% de los tumores, se pueden utilizar los marcadores informativos RFLP para seguir la herencia del cromosoma mutado. La frecuencia de LOH (72%) fue la misma en tumores heredados y no heredados, posteriormente se confirmó en retinoblastoma familiar que el cromosoma 13 que permaneció en el tumor fue el cromosoma heredado del padre afectado, el desarrollo de LOH en tumores de retinoblastoma fué específico para el cromosoma 13, ya que todos los demás cromosomas probados mantuvieron la heterocigosidad constitucional (Gallie y col., 1990).

Se ha propuesto que en los casos (30%) restantes que permanecen heterocigotos cercano al locus Rb1, se debe a que existen otro tipo de alteraciones como el propuesto por Strzaker C. y col., (1997) en donde menciona que el estado de metilación del promotor del gen Rb1 es importante. En su trabajo determinaron el estado de metilación de todas las secuencias

CpGs en la región promotora con la finalidad de determinar, si los sitios involucrados a la unión a factores de transcripción estaban metilados anormalmente. Encontraron hipermetilación a través de todas las secuencias CpGs del promotor, por lo que sugieren además que la actividad normal de la metil transferasa (DNA MTasa) está en duda, debido no solo a que metila anormalmente el DNA de tumor sino que mantiene anormal el patrón de metilación en el cáncer es diferente a la de células normales, por lo que es importante estudiar no solo el patrón de metilación anormal sino además relacionarlo con el estudio de actividad de DNA Mtasa en tumores (*Stirzaker C y col., 1997*) Otros mecanismos que podrían contribuir al desarrollo de retinoblastoma se incluyen la expresión anormal de n-myc, (*Doz F. y col., 1996*), asociación de la proteína pRb con oncoproteínas virales, alteración de un gen diferente a Rb1 (Rb2/pRb130), alteración de las desacetilasas HDAC1 (*Baldi A y col., 1996, Brehm A., 1998, Goodrich W D y col., 1993*)



**Figura 2.** Representación del gen Rb1. **A.** Gen Rb1 de 200 Kb, constituido de 27 exones representados por las líneas verticales numeradas en colores y 26 intrones mostrados en color azul. **B.** Estructura del RNAm del gen Rb1 de 4.7 Kb, los números indican la posición de los exones. Los colores indican las regiones que codifican para los diferentes dominios de la proteína pRb. **C.** Proteína pRb en donde se observan los dominios N (amino), A, región espaciadora, B, NLS (señal de localización nuclear), DEADG (sitio consenso que es hidrolizado por caspasas-1), (Wang J. Y., 1997) C y los sitios de fosforilación, (Taya Y., 1997) esta proteína esta formada por 928 aminoácidos

## H. Estudios moleculares del gen Rb1.

El evento que dispara la proliferación maligna en el 70% de retinoblastomas es la pérdida de heterocigosidad para la región 13q14, así que el alelo normal del gen del retinoblastoma se pierde y el alelo Rb1 ya mutado permanece en el tumor (Zhu y col., 1989) Los mecanismos que se han propuesto responsables de la inactivación del gen Rb1 son:

### Mutaciones en el gen RB1

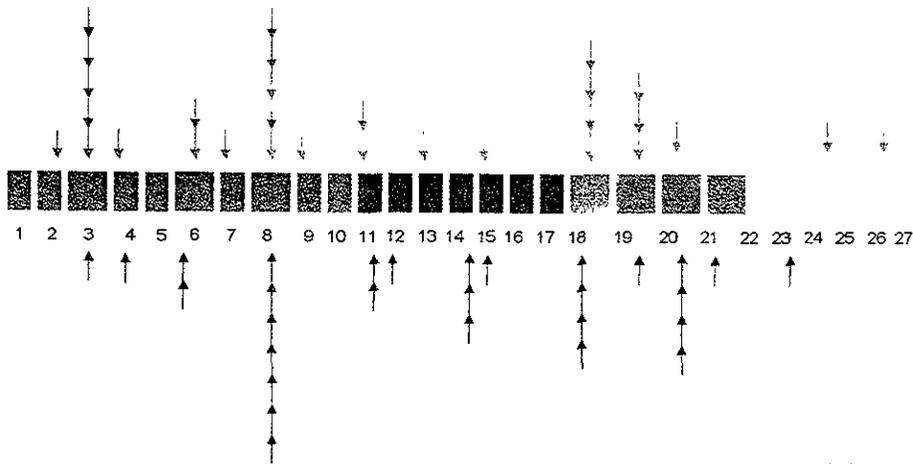
Se han hecho varios intentos para identificar las mutaciones que originan la inactivación del gen Rb1. Mediante estudios previos hechos por Lohmann D. y col., (1992) en pacientes con retinoblastoma se detectaron mutaciones en los exones 16, 20 y 23 del gen, en otro estudio Lohmann R D. y col., (1994), analizaron 106 pacientes con retinoblastoma hereditario e identificaron 20 deleciones pequeñas (de 1 a 18 pb) y siete inserciones distribuidas a lo largo del gen Por otro lado Blanquet y col., (1995) analizaron el espectro de mutaciones germinales en el gen Rb1 de 232 pacientes con retinoblastoma hereditario y no hereditario, exploraron los 27 exones y secuencias flanqueantes además del promotor, encontraron que la mayoría de mutaciones era de tipo puntual entre otras, duplicaciones, inserciones y deleciones y éstas se encuentran distribuidas a lo largo del gen, la población estudiada mostró un mayor número de mutaciones en los exones 3, 8, 18 y 19. (Figura 3) Lohmann D. y col., (1996) estudiaron 119 pacientes con retinoblastoma hereditario, el análisis de hibridación por Southern blot mostró mutaciones en 48 pacientes, en los 71 pacientes restantes detectaron mutaciones en 51 (72%) aplicando análisis heteroduplex, SSCP no isotópico y secuenciación directa que identificó transiciones recurrentes en la mayoría de los 14 codones CGA dentro del gen Rb1, no se observó mutación en los exones 25-27, sin embargo esta región contiene 2 codones de CGA, esto sugiere que podrían existir otro tipo de mutaciones en estos exones que estén involucrados en el desarrollo de retinoblastoma. (Figura 3) De los 119 pacientes con retinoblastoma se encontraron mutaciones en 99 de ellos (83%), el espectro de mutaciones comprendió, 15% con deleciones grandes en el gen, 26% alteraciones de pequeña longitud y el 42% sustitución de bases. En otro estudio Cowell y col., (1996) analizaron los 27 exones del gen Rb1 en el DNA constitucional de pacientes con retinoblastoma, en donde se una transición de C por T convirtiendo un CGA (Arg) por un codon de terminación TGA en el exón 17 y una eliminación de 8 pb en el exón 20 que originó un codón de terminación río abajo del sitio donde inicia la transcripción del gen Rb1

Blanquet y col., (1993) analizaron 120 pacientes con retinoblastoma, usaron PCR combinado con electroforesis en geles con gradiente desnaturalizante (DGGE) para detectar mutaciones puntuales, eliminaciones pequeñas o inserciones. Encontraron 10 alteraciones. 5

de éstas afectaron el marco de lectura generando codones de paro que originaron proteínas truncadas, otras alteraciones originaron sustitución de aminoácidos o alteración del procesamiento de corte y empalme del RNA (*Blanquet y col., 1993*)

Kato y col., (1994) detectaron en el gen Rb1 mutaciones constitucionales (dos deleciones intragénicas y dos deleciones puntuales) en 4 de 10 pacientes con retinoblastoma hereditario. Las mutaciones puntuales con sentido equivocado TGT, cisteína → TAT, tirosina se encontraron en el codón 706 del exón 21 que corresponde al dominio de la proteína pRb esencial para la unión del antígeno grande T del virus de Simio 40 y para la proteína E1A de adenovirus. Se ha sugerido que la mutación en este codón interfiere con la unión a oncoproteínas *in vitro* y con la fosforilación *in vivo* (*Kato V. M. y col., 1994a, Kato V. M. y col., 1994b*).

Anteriormente no se conocía una región preferencial de mutación en el gen Rb1, pero de acuerdo a los estudios mencionados, se sugiere que las secuencias CGA son regiones susceptibles a mutaciones originando en su mayoría codones de paro. La metilación de secuencias CpGs de DNA exónico favorece el fenómeno de desaminación en las citosinas, originando mutaciones puntuales (en la línea germinal) que pueden generar enfermedades genéticas, la mayoría de éstas son transiciones C→T. Esto se debe a que la 5 metilcitosina (m5C) es altamente mutable por desaminación generando mutaciones transicionales (C→T) en los CpGs, como consecuencia estas secuencias pueden ser puntos calientes de mutación en una variedad de genes. La metilación en el gen Rb1 ha sido estudiada por Mancini D. y col., (1997), en su trabajo determinaron que el estado de metilación de CpGs exónicos en el gen Rb1 contribuye a la hipermutabilidad de estos sitios ya que identificaron mutaciones en la mayoría de los 14 codones CGA de este gen con la excepción de los exones 25-27, a pesar de que en estas regiones existen CGA y reportan que en 119 pacientes el 69% tenía una sustitución de una base en los codones CGA que condujo a codones de terminación. Los exones involucrados con mutaciones recurrentes (reportadas) son 8 y 14, ambos tienen 3 codones CGA y sugieren que las regiones hipermetiladas podrían ser puntos calientes para las mutaciones (*Hogg y col., 1993; Mancini D. y col., 1997*)



**Figura 3.** Representación de la distribución de mutaciones en el gen Rb1 en pacientes con retinoblastoma. En la parte superior las flechas rosas señalan la distribución de las mutaciones en la línea germinal, de *Blanquet y col., (1995)* En la parte inferior se indica con flechas verdes el espectro de mutaciones en la línea germinal de pacientes con retinoblastoma hereditario, datos tomados de *Lohmann y col., (1996)* Los números indican los exones en diferentes colores que representan los dominios de la proteína pRb mostrados en la Figura 2.

## I. La proteína pRb producto del gen RB1.

### a). Propiedades de la proteína de retinoblastoma

El conocimiento acerca de la función de proteínas nuevas algunas veces se puede encontrar en la secuencia de aminoácidos o de su DNA. *Friend y col., (1986)* desarrollaron comparaciones de secuencia con el cDNA de Rb1 para investigar los dominios funcionales, su análisis encontró poca evidencia de una propuesta previa de la existencia de un sitio de unión a un metal y concluyeron que el gen Rb1 codifica para una proteína de un tipo no caracterizado (*Friend y col., 1986*)

El producto del gen Rb1 se identificó con anticuerpos dirigidos contra tres péptidos sintéticos, cuya secuencia se dedujo de la secuencia del cDNA del gen Rb1 y contra una

proteína de fusión TrpE-Rb que se expresó en *E. coli*. Los anticuerpos policlonales inmunoprecipitaron una proteína de 110 kD de células humanas normales, también detectada en otras especies de vertebrados. La proteína no se encontró en líneas celulares de retinoblastoma, lo que confirmó la pérdida de la función de ésta en retinoblastomas (Goodrich W D, y col., 1993) En 1987 Lee y col., prepararon antisueros de conejo contra una proteína de fusión y purificaron un anticuerpo anti-pRb que precipitó una proteína de 110 a 114 Kd. Esto dio como resultado el conocimiento de varias características importantes de la proteína pRb como:

Primero, mediante el fraccionamiento subcelular de células marcadas con  $^{35}\text{S}$ -metionina en fracciones nucleares, citoplásmicas y membranales se demostró que el 85% de la proteína de Rb1 permanece en el núcleo, lo cual se confirmó además con tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-pRb. Segundo, cuando las células se marcaron con ácido fosfórico- $^{32}\text{P}$ , el anticuerpo anti-pRb inmunoprecipitó una proteína marcada con  $^{32}\text{P}$  idéntica a la proteína pRb (pp110<sup>RB</sup>) (Scriver Ch y col., 1995). Por lo anterior se considera que el producto del gen Rb1 es una fosfoproteína nuclear de aproximadamente 110 kd (Gallie y col., 1990), con 17 sitios potenciales de glicosilación (Taya Y 1997) y un cierre de leucina codificado en el exón 20, indicado por la presencia de leucinas periódicas cada siete aminoácidos en una alfa hélice que se cree importante para la dimerización de proteínas. Además en la región que contiene los aminoácidos 663 a 716 existen 14 prolinas de los 54 que se encuentran en la proteína; esta región rica en prolina se ha observado en los oncogenes nucleares como, *c-myc*, y *c-myb* (Scriver Ch y col., 1995)

Una serie de características del producto del gen Rb1 como; 1) la fosforilación de la proteína, 2) la relación entre fosforilación y vida media (la vida media de la proteína no fosforilada es de al menos 6-12 horas, mientras que la pRb fosforilada tiene una vida media más corta) y su 3) distribución ubicua sugiere que pRb podría ser una proteína que se une al DNA en donde ejerce su actividad de supresor de tumor a través de la regulación de la transcripción de una variedad de genes celulares (Scriver Ch. y col., 1995; Goodrich, D.W., 1993).

#### **b). Caracterización estructural y bioquímica de la proteína pRB**

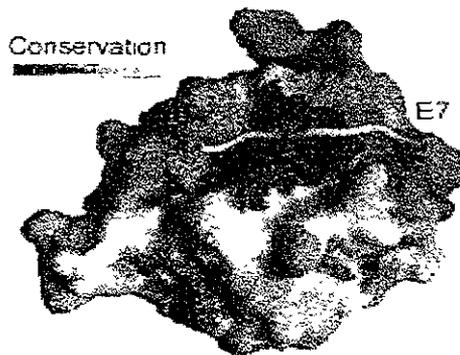
El dominio de la proteína pRb responsable de supresión de crecimiento celular abarca de los aminoácidos 395 al 876 y contiene tres sitios de unión a proteínas denominados dominio A, B y C como se muestra en la Figura 2. A estos dominios se pueden unir varias proteínas tanto celulares como virales que tengan la secuencia de aminoácidos LXCXE (donde X es cualquier aminoácido). La unión de esta secuencia (LXCXE) es en los dominios A y B, el factor de transcripción E2F se une a los dominios A/B y C; por otro lado C-Abl o Mdm-2 se unen al dominio C. La proteína pRb también tiene una señal de localización nuclear (NLS) y un sitio

consenso que es hidrolizado por la familia de proteasas caspasa-3/ICE (entre los aminoácidos 886 y 887) durante la respuesta a la muerte celular. Este sitio consenso se encuentra fuera del dominio de supresor de crecimiento celular, la hidrólisis en este dominio puede comprometer la función de protección de pRb contra la muerte celular (**Figura 2**). La unión de factores de transcripción a la proteína pRb probablemente sea la base funcional de ésta para regular la expresión de genes y la proliferación celular. Dado el hecho de que a pRb se unen varios factores de transcripción, de esta manera coordina la regulación de algunos genes que son relevantes para el control del crecimiento celular (*Wang J, 1997*)

Una de las propiedades que se han descubierto mediante la purificación de la proteína pRb fué la capacidad para asociarse con columnas de DNA-celulosa. Usando la proteína de fusión trpE-Rb, Wang y col, (1997) demostraron que esta actividad de unión no específica al DNA fue intrínseca para la región carboxilo terminal de pRb, las proteínas de fusión que tienen los exones 19 al 27 se unen al DNA con alta especificidad mientras que las proteínas que no tienen esos exones tienen reducida la capacidad de unirse al DNA (*Wang y col., 1997*)

Otra propiedad bioquímica de la proteína pRb es su capacidad para formar complejos específicos con oncoproteínas producidas por algunos virus de DNA transformantes como son; el antígeno T (LT) de SV40, la proteína E1A tipo 5 de adenovirus de humano y la proteína E7 de tipo 16 y 18 del virus de papiloma (**Figura 3**). Cuando las oncoproteínas se unen a pRb alteran sus funciones en el control del ciclo celular. Es importante saber que la oncoproteína LT se une específicamente a la forma hipofosforilada de pRb, el complejo LT-pRb solamente se puede detectar en fase G1 cuando solo la forma hipofosforilada está presente. Estas observaciones favorecieron la hipótesis de que la forma hipofosforilada de pRb inhibe la entrada a la fase S y la fosforilación o neutralización por unión a LT permite a la célula entrar esta fase (*Stahl A y col., 1994*) Por otro lado, se conocen los aminoácidos necesarios para la unión al antígeno T de SV40 y se ha observado que para la formación del complejo se requieren dos regiones distintas que incluyen los aminoácidos 394 al 571 y del 649 al 773. Por otro lado se requieren cuatro de ocho cisteínas que están dentro o cerca de esta región para una conformación específica de la proteína para unirse a otra oncoproteína como la E7 del virus de papiloma. Estas regiones corresponden a las más frecuentemente mutadas incapaces de formar complejos con el antígeno T. La estabilidad del complejo entre las proteínas virales y pRb varía, ya que se han reportado proteínas virales con capacidad de transformación débil, que forman complejos menos estables con la proteína pRb que las asociadas con mayor actividad transformante. Es posible que las proteínas virales de DNA inducen la transformación

uniéndose a la forma activa de la proteína pRb, inhibiendo así su función normal de supresión  
(Gallie y col., 1990, Goodrich D W., 1993)



**Figura 3.** Complejo de la proteína de retinoblastoma (pRb) con la oncoproteína viral E7, la cual frecuentemente se une a pRb y bloquea su función en este caso en cáncer cervical. La intensidad del color verde indica la conservación de los aminoácidos en pRb y proteínas relacionadas.

El mecanismo de transformación por virus de DNA de tumor es más complejo que la simple inactivación de la proteína pRb, varios reportes indican que la unión a la proteína pRb no es suficiente para inducir la transformación de algunos virus de DNA, las proteínas transformantes además se unen a otras proteínas celulares como p53 que pueden ser importantes en el control del ciclo celular (Gallie y col., 1990; Goodrich D W., 1993)

#### C). Funciones de la proteína pRb

El proceso de proliferación celular se puede subdividir en las siguientes etapas; latencia (G0), preparación para la replicación del DNA (G1), duplicación del DNA (S), preparación para mitosis (G2) y división celular (M). Existen varios estudios, como el que se realizó en ratones mutados en ambos alelos del gen Rb1 ( $Rb1^{-/-}$ ), que sugieren la existencia de tres funciones para la proteína pRb las cuales son

- 1 Inhibición a la entrada de la fase S
- 2 Supresión de crecimiento celular
- 3 Protección contra la muerte

### 1. Inhibición a la entrada de la fase S y supresión de crecimiento

La fase G1 del ciclo celular eucarionte contiene importantes puntos de chequeo ("checkpoints") para continuar o salir de éste. Estudios genéticos en levaduras han definido un punto control previo a la fase S, llamado "inicio", en este punto la célula toma la decisión para continuar con la siguiente etapa del ciclo celular, por lo que el secuestro de factores de crecimiento antes del punto de restricción en G1 evita la entrada a la siguiente fase S y la célula queda en un estado de latencia, conocido como G0. Se sabe que pRb tiene un papel importante en un punto de restricción en la fase G1 ya sea para permitir que salga del ciclo celular o para demorar la entrada a la fase S (*Goodrich, D W., 1993*)

La función de pRb en la inhibición a la entrada de la fase S, dependiente de E2F, es el mecanismo más eficiente; sin embargo la pérdida de esta función como en el caso de la mutante pRb-661W que tiene una mutación puntual en el dominio B y por lo tanto no se une a la proteína E2F, no inactiva completamente la actividad de supresión de tumor. Debido a esto se propuso que existe otro dominio (C) que también tiene una función importante en la regulación del ciclo celular. Otra evidencia de que pRb regula la entrada a la fase S es su expresión ectópica que induce prolongación de la fase G1 en diferentes tipos celulares. Esto es apoyado por los reportes de fibroblastos derivados de embriones que tienen el gen *Rb1<sup>-/-</sup>*, los cuales tienen una fase G1 más corta que los embriones *Rb1<sup>+/+</sup>*. Existen otras proteínas relacionadas a pRb como p107, p130 y la recientemente identificada RbF de *Drosophila* que también regulan a E2F y son capaces de inhibir la entrada a la fase S. Además, la sobreexpresión desregulada de E2F estimula la entrada a la fase S e induce la transformación celular. La función estimuladora de E2F para entrar a la fase S se puede explicar por el hecho de que los sitios de unión a E2F están presentes en los promotores de algunos genes activados en G1/S, incluyendo la ciclina E y la ciclina A, que son esenciales para la estimulación de síntesis del DNA (*Wang J., 1997*)

La mejor interacción caracterizada es la asociación de la proteína pRb con el factor de transcripción E2F, por lo que el posible papel de pRb está en la regulación de la transcripción de estos. Originalmente se descubrió a E2F a través de su función en la activación del promotor E2 de adenovirus, además de que puede regular otros genes que son importantes para el ciclo celular debido a que el sitio de unión a DNA de E2F se encuentra en los promotores de genes como DNA polimerasa  $\alpha$ , ribonucleótido reductasa, c-myc, timidilato sintetasa y c-myb. El complejo pRb/E2F se forma en las fases G1 y S del ciclo celular, Hamel y col., (1992), demostraron que el adenovirus E1aE, c-myc y los promotores del gen *Rb1* pueden ser reprimidos por la sobreexpresión del gen *Rb1*. Para observar la represión, en cada caso se

requiere que en el promotor de estos genes exista una secuencia de unión a E2F, la presencia de un sitio E2F en el gen Rb1 sugiere que la pRb puede regular su propia expresión. Estos resultados sugieren que la unión al promotor del gen Rb1 convierte a E2F de un activador a un inhibidor de la transcripción (Hamel y col., 1992)

Muchos investigadores se han dedicado al estudio de los mecanismos involucrados en la regulación de la proliferación celular por la proteína de retinoblastoma pRb y han llegado a la conclusión de que la proteína tiene una función muy importante dentro del núcleo, en la transducción de señales extracelulares para detener la multiplicación celular. La variación en la fosforilación de la proteína pRb durante el ciclo celular, su unión a oncoproteínas virales y asociación con proteínas reguladoras del ciclo celular sugieren que pRb puede afectar el crecimiento celular mediante el control de la fase S del ciclo celular (Goodrich D W., 1993)

Para determinar la función de pRb, se ha estudiado su estado de fosforilación durante el ciclo celular (Yen A., y col., 1994). En las fases tempranas de G0 y G1, pRb se encuentra hipofosforilada (forma activa), la fosforilación de pRb ocurre entre las fases G1 y S y aumenta en las fases G2 y M (forma inactiva), cuando la célula termina la mitosis pRb se desfosforila (Goodrich D W., 1992). Los diferentes estados de fosforilación de pRb durante el ciclo celular sugieren que pRb es un sustrato de los complejos CDK-ciclina, la expresión, fosforilación y formación de los complejos CDK-ciclina durante la fase G1 tardía, están asociados a la inactivación de pRb, (Zhang K., 1994, Gibson T J y col., 1994), como es el caso de CDK2 que se une a pRb y la fosforila en serina o treonina *in vivo*, (Yamamoto M. y col., 1994) y CDK4-D fosforila a pRb *in vitro* (Hall F L y col., 1993). Las ciclinas E y D se acumulan en la fase G1 tardía y se expresan para fosforilar a pRb (Gibson T J y col., 1994), mientras que la expresión de la ciclina A ocurre en la fase S temprana y en la fase G2, cuando pRb se encuentra hiperfosforilada. En general, las ciclinas D2 y D3 son más estables para formar complejos específicos con pRb que las ciclinas A y E (Hall F L y col., 1993)

### 3. Protección contra la muerte celular.

Las células deficientes en la proteína pRb parecen ser más propensas a la muerte, esto se observó primero en embriones de ratón  $rb1^{-/-}$ , en células que expresan oncoproteínas virales que alteran la función de pRb y en células que expresan mutantes dominantes negativas de pRb. La muerte que resulta de la pérdida de pRb se puede bloquear por la eliminación de p53, ya que existe relación entre la pérdida de pRb y la activación de p53 a través de E2F-1. La sobreproducción de E2F-1, que es capaz de dirigir la entrada a la fase S, también conduce a apoptosis dependiente de p53. El complejo E2F-1/DP-1 (DP-1 es un heterodímero de E2F que funciona en asociación con este factor de transcripción) induce la muerte celular y correlaciona

con una acumulación de la proteína p53, sugiriendo que E2F-1 puede activar a p53 para inducir la muerte celular. Para apoyar estos resultados Field S. J., and col., (1996) encontraron bloqueo en la muerte de células de timo de ratón deficientes en E2F-1, sugiriendo que E2F-1 tiene un papel fisiológico en muerte celular programada, la inhibición de E2F-1 puede además explicar la actividad anti-apoptótica de pRb (Field S. J. and col., 1996). De hecho Kogan y col., (1995) demostraron que pRb tiene una nueva función que es la de suprimir la apoptosis, en este estudio trabajaron con líneas celulares deficientes en pRb en donde cuantificaron la viabilidad celular para demostrar que la radiación ionizante induce menos muerte celular en células que expresan pRb. Esta nueva función de la proteína de retinoblastoma tiene importantes implicaciones para el desarrollo normal y transformación neoplásica, que además requieren un estrecho balance controlado entre la proliferación y la apoptosis (Kogan H. A. D. y col., 1995, Wang J., 1997).

La muerte celular programada resulta de la activación de una familia de caspasas (Martins L. M. y col., 1997) de cisteína, como es el caso de las caspasas-1 (ICE) de mamífero y Ced3 de *C. elegans*, esta familia de proteasas está regulada por mecanismos desconocidos. Se piensa que los reguladores transcripcionales como p53, pRb y E2F-1 actúan upstream del gen de las caspasas (río arriba) regulando su transcripción. Una vez que se activan las proteasas éstas rompen sitios específicos de proteínas para matar a la célula, de manera interesante la proteína pRb contiene un sitio consenso de corte Ced3/ICE, DEADG situado en el extremo carboxilo que ocasiona que pRb sea degradada en células expuestas a drogas genotóxicas (Wang J. 1997)

#### d). Interacciones celulares de la proteína pRb

La presencia de un cierre de leucina en pRb sugiere que ésta puede interactuar con otras proteínas por medio de esta estructura. Varios grupos de investigadores han observado interacciones de las familias de proteínas *fos-jun* y *myc* mediadas por el cierre de leucina (Gallie B. L. y col., 1990)

La unión de oncoproteínas virales a pRb y su consiguiente liberación sugiere que puede haber proteínas celulares que antagonizan la actividad de pRb. Esas proteínas podrían ser secuestradas por pRb y mantenerse en una forma inactiva hasta que la fosforilación de pRb las hace disponibles para realizar su función normal dentro de la célula. Para determinar las regiones en el gen Rb1 que codifican para la unión de oncoproteínas virales y otras proteínas regulatorias, se generaron una serie de mutaciones con eliminaciones en diferentes regiones que codifican para esta proteína. Los datos demostraron dos regiones distintas no contiguas en pRb necesarias para formar complejos con esas oncoproteínas, además se determinó que se requería una región espaciadora entre estos dos bloques para mantener la integridad de esta

unión, la comparación de estas regiones de unión con las mutaciones más frecuentes en Rb1 que ocurren de manera natural reveló una estrecha similitud (*Scriver Ch y col., 1995*)

Se ha observado que la proteína pRb se une a otro tipo de proteínas celulares, como es el caso de las oncoproteínas. Los oncogenes que actúan de manera dominante son candidatos para ser regulados normalmente por el gen Rb1, por ejemplo, N-myc es un protooncogen que se expresa normalmente en etapas tempranas del desarrollo de múltiples tejidos, la amplificación genómica del gen N-myc primero ocurre en tumores neuroectodermales, incluyendo algunos tumores de retinoblastoma, y está asociado con mal pronóstico clínico en neuroblastoma (*Gallie B L y col., 1990*) La proteína c-myc parece ser un buen candidato como antagonista celular de pRb ya que se localiza en el núcleo, se puede asociar físicamente con la pRb *in vitro* y la sobreexpresión del gen c-myc conduce a la célula a proliferación y bloquea la diferenciación. Esta posibilidad se ha confirmado ya que la coinyección de c-myc inhiben la capacidad de pRb de arrestar el ciclo celular, lo cual no sucede cuando pRb se coinyecta con EJ-ras, c-fos o c-jun, por otro lado c-myc no inhibe la actividad de otros genes supresores de tumor. Sí pRb y c-myc funcionan en la misma red regulatoria, entonces el fenotipo producido por la activación de c-myc podría ser similar al fenotipo que resulta de la inactivación de la pRb (*Goodrich, D W., 1993*).

#### **J. Familia de proteínas de retinoblastoma**

Existe una familia de proteínas de retinoblastoma que están involucradas en el control de tres mecanismos del ciclo celular como son; a) proliferación celular, b) diferenciación y c) apoptosis. El producto del gen Rb1, la proteína pRb funciona como un transmisor crucial entre las señales celulares que controlan la proliferación y la maquinaria de transcripción nuclear. Se ha reportado la existencia de dos genes celulares relacionados al gen Rb1, estos genes p107 (RbL1) y pRb2 ó p130 codifican proteínas que son estructural y funcionalmente similares a la proteína pRb (*Mulligan G. y col., 1998*)

Se sabe además que cada una de las oncoproteínas virales que se unen a pRb también interacciona con las proteínas celulares p107 y p130, la interacción ocurre en un dominio de unión bipartito (compuesto del dominio A y subdominios B) que está muy conservado en la familia de proteínas de retinoblastoma (*Mulligan G. y col., 1998*).

El gen que codifica para la proteína p130 se localiza en el cromosoma 16 en la región 16q12.2 (*Claudio y col., 1994*), contiene 22 exones que se distribuyen sobre 50 Kb, tiene varias secuencias ricas en GC y sitios potenciales de unión a factores de transcripción. Frecuentemente la región 16q12.2 se ha reportado delecionada o con pérdida de heterocigosidad (LOH) en varios tumores humanos de mama, ovario, hepatocelulares y carcinoma prostático (*Baldi A y col*

y carcinoma prostático (*Baldi A y col., 1996*) Por otro lado, no se conoce la localización del gen que codifica para la proteína p107 pero se sugiere que podría estar en regiones cromosómicas que frecuentemente se encuentran delecionadas en algunos tumores (*Jiang y col., 1997*) Las proteínas p107 y p130 están estrechamente relacionadas ya que tiene una homología de ~50% en cuanto al tipo de aminoácidos, con respecto a la proteína pRb, cada una tiene 30-35% de homología. Los dominios A y B de la proteína pRb se encuentran conservados en las proteínas de p107 y p130. En contraste, la mayoría de las secuencias fuera de estos dominios las secuencias espaciadoras que están entre los dominios A y B están conservadas entre p107 y p130 pero tienen poca similitud con pRb. Las secuencias espaciadoras contribuyen a la capacidad de p107 y p130 para unirse a las ciclinas A-CDK2 y E-CDK2, aunque la función de estas interacciones no es muy clara, la demostración de que p130, p107 y pRb interactúan con distintas proteínas proporciona el primer indicio de que la familia de proteínas de retinoblastoma podría tener funciones únicas (*Mulligan G y col., 1998*).

Se ha demostrado que las proteínas pRb, p107 y p130 interactúan con otras proteínas celulares, pero aún no está muy claro cuál de esas moléculas son blancos específicos para la regulación de la familia de proteínas de retinoblastoma *in vivo*. Aunque varias de estas proteínas se pueden asociar con cada miembro de esta familia, incluyendo MYC, desacetilasa de histonas (HDAC1), HBP1 y ciclinas parecen interactuar con un subgrupo específico de la familia, como se muestra en la Tabla I (*Mulligan G. y col., 1998*).

Tabla I. Proteínas que se unen a la familia de proteínas pRb.

Proteína de unión	Función putativa	pRb	p107	p130	Dominio LxCxE
E2F1-E2F3	R. T. control del crecimiento	+	-	-	
E2F4	R T. control del crecimiento	+	+	+	
E2F5	R T control del crecimiento	-	+	+	
MYC	R T control del crecimiento	-	+	-	
Familia BRG	Remodelación de la cromatina	+	+	+	+
HDAC1	Remodelación de la cromatina	+	-	ND	+
MDM2	Inhibidor de p53 (TP53)	+	-	ND	
ABL	Tirosin cinasa	+	ND	ND	
TFIIIB	R T RNA Pol III	+	ND	ND	
UBF	R T RNA Pol I	+	ND	ND	
TAF250	R T. RNA Pol II	+	ND	ND	
Ciclinas A y E	Regula actividad de CDK	-	+	+	
Ciclinas tipo D	Regula actividad de CDK	+	-	-	+
HBP1	R T represión	+	-	+	+
ELF1	R T linfide	+	ND	ND	+
PU.1	R T linfide	+	ND	ND	
Familia C/EBP	R T. estirpe específica	+	ND	ND	+
Miogenina MYOD1	R T control miogénico	+	+	ND	
ATF2	Regula la transcripción	+	ND	ND	

Tabla I. Proteínas celulares que se han detectado asociadas con pRb, p107 y/o p130, además también se indican sus funciones putativas. La presencia de un dominio LxCxE, similar al de las oncoproteínas virales también se observa en algunas de estas proteínas. Abreviaturas; ND= no determinada, Pol= polimerasa, X es cualquier aminoácido, RT= Regulación de la transcripción. Tomada de Mulligan G. y col., 1998.

## K. Genes supresores de tumor en otras enfermedades malignas

### a). Pérdida de heterocigosidad (LOH) en otros cánceres.

El evento de LOH para el cromosoma 13 en retinoblastoma, ha sugerido el estudio de otras enfermedades malignas para tratar de localizar otros genes supresores de tumor importantes en tumorigénesis. Cualquier locus génico involucrado comunmente en LOH en un tumor específico se debe considerar el posible sitio de un gen supresor de tumor, debido a que la LOH ocurre frecuentemente por recombinación mitótica, es posible precisar la localización precisa de estos genes. El primer tumor que se examinó por LOH fue el tumor de Wilms, un tumor embrionario del riñón en donde está involucrado un locus autosómico sobre el cromosoma 11 que se le relacionó por deleciones citogenéticas en 11p13 y 11p15 (Stahl A. y col. 1994)

#### b). Cambios somáticos en el gen Rb1 en otros cánceres.

Uno de los primeros estudios sobre alteraciones del gen Rb1 en tumores que no se asociaban al desarrollo de retinoblastoma, fue el carcinoma de células pequeñas de pulmón (SCLC). Los cambios estructurales en el gen Rb1 (20% de SCLC tienen mutaciones en el gen Rb1) y la alteración de expresión de este gen ya sea en la proteína o en el mRNA se observaron en líneas celulares de este carcinoma, lo que proporciona la base para concluir que la pérdida de la función de pRb es importante en el desarrollo de este tipo de tumor (*Hensel Ch y col., 1990*) En otros estudios realizados en carcinoma de células no pequeñas de pulmón (NSCLC) se han obtenido resultados similares en donde no se ha observado expresión de la proteína pRb en el 28% de NSCLC estudiados (*Xu J y col., 1991*)

El osteosarcoma, el segundo tumor más común en pacientes con retinoblastoma hereditario, muestra LOH para el cromosoma 13 en el 70% de los casos en pacientes con o sin antecedentes familiares de la neoplasia. Cualquiera que sea el caso; el locus que predispone a sarcoma osteogénico está estrechamente relacionado con el desarrollo de retinoblastoma o las mutaciones en el gen Rb1 predisponen a otros tumores además de Rb (*Gallie L. B. y col., 1990*)

Después de la clonación del gen Rb1, ha sido posible examinar varios tumores con anomalías en éste. *Friends y col., (1986)* reportaron mutaciones somáticas en Rb1 en el 20% de osteosarcoma y tumores mesenquimales, en pacientes con o sin predisposición a retinoblastoma. Además otros investigadores han encontrado mutaciones en el gen Rb1 en otras enfermedades como es el caso de cáncer de mama (*Gallie L. B y col., 1990*)

Además se han observado mutaciones en el gen Rb1 en otros tipos de tumor como sarcomas, carcinoma de células pequeñas del pulmón (*Harbour J. W., y col., 1988; Hensel Ch y col., 1990; Xu H. J., y col., 1991*), astrocitomas (*Tsuzuki T y col., 1996*), osteosarcomas (*Friend S. H y col., 1986*), cáncer de próstata (*Bookstein R. y col., 1990*) y cáncer de vejiga (*Horowitz J M y col., 1990*), además de leucemias. En estos tipos de cánceres la participación del gen Rb1 es casi siempre la consecuencia de mutaciones somáticas y probablemente es parte del proceso complejo que involucra varias etapas (*Stahl A. y col 1994*).

#### L. Hipótesis molecular para la patogénesis del retinoma y la baja penetrancia de la mutación del gen Rb1 en algunas familias.

Cuando los padres y parientes sanos de niños con retinoblastoma son examinados cuidadosamente, se observa que el 2% de éstos presentan lesiones retinianas estables con tres características distintivas; una masa grisacea translúcida que se extiende de la retina hacia el humor vítreo, calcificación tipo "queso cottage" dentro de la masa, un pigmento epitelial y anomalías coroidales. Debido a que estas lesiones, en pacientes que nunca han recibido

ningún tipo de terapia, son muy parecidas a tumores tratados sucesivamente con radiación, originalmente fueron llamados como regresión espontánea de retinoblastoma. Esta terminología implicó un mecanismo de defensa del hospedero, por el cual un tumor maligno podría ser controlado por medios naturales. En 1981 Gallie B. I. y col., proponen el término de retinoma, éste y el retinoblastoma están estrechamente relacionados por el hecho de que el 50% de retinomas ocurren en individuos que tienen parientes que padecen de retinoblastoma, u ocurre en el ojo sano de individuos que padecieron retinoblastoma unilateral. Se pueden proponer al menos tres modelos genéticos para explicar la expresión variable del fenotipo de esta neoplasia en individuos en una familia en donde todos tienen la misma mutación germinal en el gen Rb1.

**Primero.** Solamente los retinoblastos primitivos que tienen capacidad proliferativa son susceptibles a la transformación por mutaciones en el gen Rb1, las células retinianas completamente diferenciadas con poca o sin ninguna capacidad proliferativa no pueden ser transformadas, por lo que las mutaciones en uno de los alelos de Rb1 en retinoblastos no tiene efecto que se pueda percibir, ya que los niños con una mutación en Rb1 en la línea germinal tienen retinas normales. Así los retinoblastos normales se diferencian progresivamente, perdiendo el potencial de renovación en cada división celular hasta que no ocurra otra división en adulto y la retina se desarrolla completamente. Las células con una mutación germinal M1 (mutación 1) heredada, se diferencian normalmente, pero si el otro alelo normal también se pierde debido a una mutación somática M2 (mutación 2), se altera la capacidad de los retinoblastos para diferenciarse, de manera que cuando M2 ocurre en un retinoblasto primitivo se desarrolla el retinoblastoma (Gallie L. B. y col., 1990).

**Segundo.** Diferentes mutaciones en el gen Rb1 pueden tener diferentes fenotipos, la iniciación de la neoplasia requiere pérdida total de la función de la proteína, si la mutación germinal es una mutación con sentido equivocado, la proteína mutada puede conservar alguna función, en este caso, la naturaleza de la segunda mutación podría afectar el fenotipo de la célula (Gallie L. B. y col., 1990)

También se puede considerar un tercer modelo, algunas proteínas pRb mutadas pueden conservar la capacidad de interaccionar solamente con algunas proteínas celulares. Si la proteína mutada tiene alterada la capacidad para unirse a regiones regulatorias y por lo tanto no funciona, esto podría bloquear parcialmente la acción de la proteína pRb del alelo normal. En este caso, no se requiere la pérdida del alelo normal para el desarrollo de retinoma o retinoblastoma; esta anomalía se puede considerar como una mutación "dominante negativa". Debido a lo anterior varios autores han sugerido las siguientes modificaciones del modelo original de Knudson (1971) (a) las mutaciones en el gen Rb1 son necesarias pero no

suficientes para inducir retinoblastoma, (b) algunas mutaciones en el gen Rb1 pueden conducir a penetrancia parcial debido a que las mutaciones no inactivan completamente la proteína pRb (Gallie L. B. y col., 1990).

De acuerdo a la mayoría de las estimaciones, el retinoblastoma tiene una penetrancia del 80-95%, sin embargo existen familias que muestran múltiples recurrencias a través de portadores que tienen susceptibilidad de adquirir la neoplasia, estos casos representan más de la cuarta parte de las familias estudiadas por Briard- Guillemot y col (1974) (citado por Sthal A y col., 1994) Los retinoblastomas, considerados como benignos, podrían corresponder a expresividad reducida de la enfermedad en individuos que portan una mutación en el gen Rb1 en una célula germinal. Se han propuesto varias hipótesis para explicar las diferencias en penetrancia y expresividad como. la "mutación postergada" propuesta originalmente por Auerbach (1956) (citado por Sthal A y col., 1994) para explicar la baja penetrancia de mutaciones en el gen Rb1 en algunas familias y la "resistencia del hospedero" (Stahl A y col., 1994)

a). Mecanismos cromosómicos de variaciones de penetrancia.

La citogenética puede explicar algunas formas hereditarias de retinoblastoma transmitido por individuos no afectados. Strong L. C y col (1981) han descrito casos de inserción balanceada de un segmento 13q14 dentro de otro cromosoma, los análisis de las posibles combinaciones cromosómicas en los gametos explica que un individuo que porta una inserción balanceada produce cuatro tipos de gametos: 1) gametos normales, 2) gametos con una inserción 13q14, la cual genera cigotos que portan una trisomía parcial 13q14, generalmente con un fenotipo normal. 3) gametos con una delección 13q14 el cual conduce a cigotos portadores de una monosomía 13q14 y 4) gametos balanceados con ambos inserción y eliminación de 13q14 (Stahl A y col., 1994).

El análisis de mutaciones en el gen Rb1 ha explicado la etiología molecular del retinoblastoma con baja penetrancia. Sakai y col., (1991), describieron dos familias con baja penetrancia, éstas presentaban una mutación puntual en la región promotora del gen Rb1 que redujo la transcripción. Onadim y col., (1992), estudiaron dos familias de baja penetrancia una con una mutación germinal con sentido equivocado y otra con una mutación que podría interferir con el empalme del exón 20. Se asume que ambas mutaciones generan una proteína pRb incompleta pero con función parcial de oncosupresor Dryja y col. (1993), han propuesto que la proteína mutada tiene una escasa función supresora de tumor. Sin embargo contrario a lo que propone Auerbach (1956) (citado por Stahl A y col. 1994), Dryja y col., (1993), proponen que la genética del retinoblastoma de baja penetrancia posiblemente se podría explicar por el tipo

de alteración en gen Rb1 más que por resistencia del hospedero o por otros mecanismos especulativos.

### **M. Origen parental de las mutaciones en el gen Rb1.**

En los casos debido a mutación del gen Rb1 en la célula germinal, las técnicas citogenéticas y marcadores polimórficos del DNA han demostrado el origen parental del cromosoma 13 mutado. Al analizar los polimorfismos del brazo corto del cromosoma 13 (*Dryja T P y col., 1989*) y los RFLP intragénicos, se demostró que la mutación germinal es de origen paterno. Estos resultados fueron confirmados por Zhu X. y col., (1989). Estos estudios sugieren que existe una diferencia significativa en el origen parental del cromosoma retenido en tumores, debido a esto se concluyó que, primero no hay selección en las células somáticas para la retención de los alelos materno o paterno de acuerdo con otros datos de retinoblastoma. Segundo, las mutaciones en el gen Rb1 en la línea germinal parece que surge más frecuentemente sobre el alelo paterno que sobre el alelo materno. Esto indica que las mutaciones ocurren durante la replicación del DNA, debido a que el número de multiplicaciones celulares es mucho más alta durante la espermatogénesis que durante la ovogénesis, ya que la multiplicación de la ovogonia solamente ocurre durante un período corto del desarrollo fetal del ovario, esto es resultado de las diferencias entre la meiosis del espermatozoide y del óvulo. Entre las posibles hipótesis, la impronta genómica y exposición ambiental, hace al gen Rb1 paterno más susceptible a las mutaciones durante el desarrollo (*Zhu X y col., 1989*)

## II. HIPOTESIS

Debido a que sólo en el 5% de individuos con retinoblastoma se observa pérdida de material genético en la región 13q14 mediante análisis citogenético. Es probable, que no se encuentren alteraciones citogenéticas en esta región cromosómica en los pacientes estudiados y que la mayoría de mutaciones que se identifiquen en este trabajo sean de tipo puntual. Por otro lado ya que la proteína pRb participa en la regulación del ciclo celular actuando como proteína supresora de tumor, se espera que no este presente en los tumores analizados

## III. JUSTIFICACION

Debido a que en nuestro país, no existen reportes del tipo de mutaciones más frecuentes en el gen Rb1 en pacientes con retinoblastoma, es necesario realizar un estudio molecular que permita identificar el tipo de alteraciones en éste. La mayoría de alteraciones genéticas asociadas con el desarrollo de retinoblastoma son deleciones pequeñas o mutaciones puntuales en el gen Rb1, por lo que es necesario implementar diversas estrategias que nos permitan analizar el tipo de mutaciones en éste. El conocimiento de esto permitirá iniciar las bases, para en un futuro proporcionar el diagnóstico molecular de retinoblastoma en individuos con susceptibilidad a adquirir la neoplasia, apoyando así al médico genetista para un mejoramiento en el asesoramiento genético

## **II. HIPOTESIS**

Debido a que sólo en el 5% de individuos con retinoblastoma se observa pérdida de material genético en la región 13q14 mediante análisis citogenético. Es probable, que no se encuentren alteraciones citogenéticas en esta región cromosómica en los pacientes estudiados y que la mayoría de mutaciones que se identifiquen en este trabajo sean de tipo puntual. Por otro lado ya que la proteína pRb participa en la regulación del ciclo celular actuando como proteína supresora de tumor, se espera que no este presente en los tumores analizados

## **III. JUSTIFICACION**

Debido a que en nuestro país, no existen reportes del tipo de mutaciones más frecuentes en el gen Rb1 en pacientes con retinoblastoma, es necesario realizar un estudio molecular que permita identificar el tipo de alteraciones en éste. La mayoría de alteraciones genéticas asociadas con el desarrollo de retinoblastoma son deleciones pequeñas o mutaciones puntuales en el gen Rb1, por lo que es necesario implementar diversas estrategias que nos permitan analizar el tipo de mutaciones en éste. El conocimiento de esto permitirá iniciar las bases, para en un futuro proporcionar el diagnóstico molecular de retinoblastoma en individuos con susceptibilidad a adquirir la neoplasia, apoyando así al médico genetista para un mejoramiento en el asesoramiento genético.

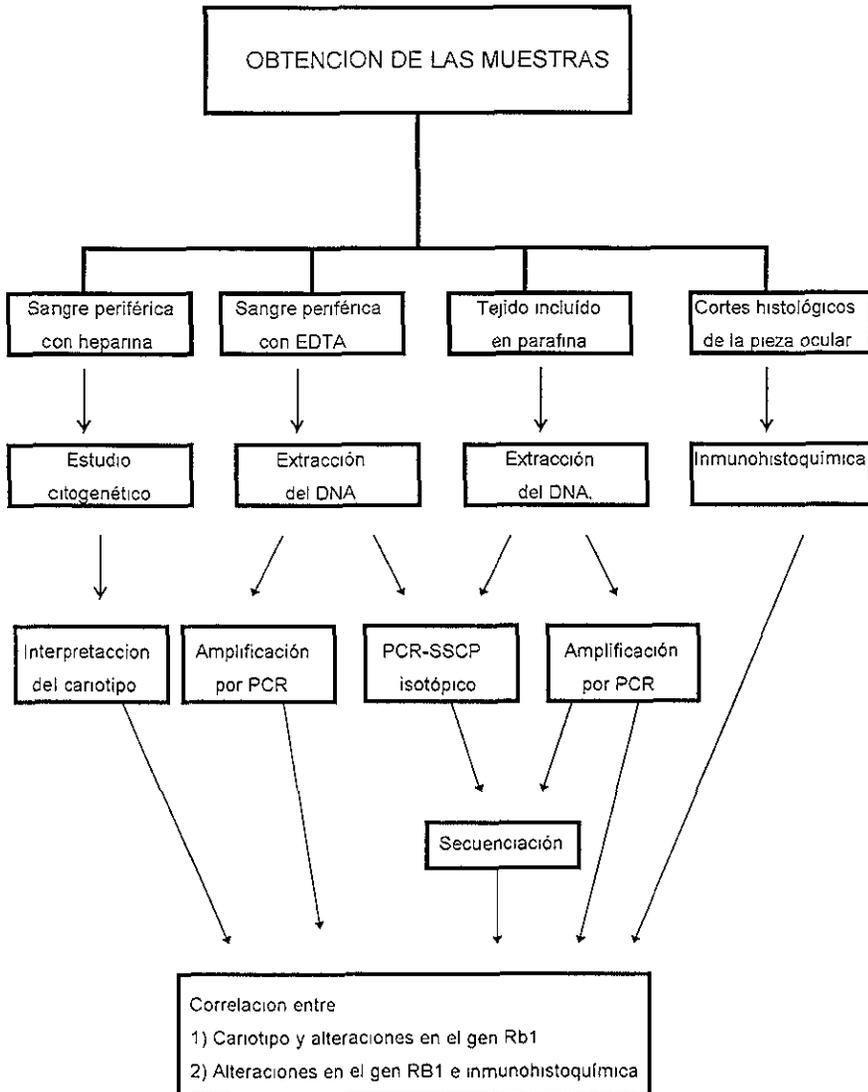
#### **IV. OBJETIVOS**

Conocer el tipo de alteraciones cromosómicas y de mutaciones en el gen Rb1, además de identificar la presencia o ausencia de la proteína pRb en cortes histológicos del tumor, en pacientes con retinoblastoma

##### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Detectar aberraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica en pacientes con retinoblastoma
- Buscar mutaciones en diferentes regiones del gen Rb1.
- Identificar la presencia de la proteína pRb y su localización en cortes histológicos de ojos con retinoblastoma, por medio de inmunohistoquímica.

## ESTRATEGIA METODOLOGICA



## V. SUJETOS Y METODOS

### A. Pacientes.

Se estudiaron 19 pacientes con diagnóstico clínico de retinoblastoma bilateral o unilateral. Estos pacientes se captaron a través del servicio de Oftalmología y Patología del Hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI, IMSS. Se contó además de la autorización por escrito para el análisis citogenético y molecular mediante una carta consentimiento del paciente o en su defecto por la persona responsable de éste.

Cráterios de inclusión

- a). Sujetos diagnosticados con retinoblastoma con o sin antecedentes familiares de la enfermedad
- b). Diagnóstico clínico, oftalmológico y patológico que confirme la neoplasia.

En todos los casos se realizó la historia familiar y se elaboró el árbol genealógico correspondiente.

### B. Citogenética.

- a). Obtención de cromosomas en metafase de linfocitos de sangre periférica.

El cultivo y la cosecha de los cromosomas se realizó mediante el método de *Yunis J. (1976)* con algunas modificaciones realizadas en el laboratorio de citogenética. Con la técnica de *Viegas-Pequignot y Dutrillaux (Viegas y col., 1978)*, se obtuvieron cromosomas con bandas de alta resolución. Los cromosomas de los linfocitos se obtuvieron de la siguiente manera.

- 1) Se tomaron 2ml de sangre periférica por venipuntura y se les agregó 0.2ml de heparina.
- 2) Se sembró por duplicado 1ml de sangre heparinizada en 4 ml de medio de cultivo McCoy (Sigma) complementado con 1.0 ml de suero fetal de ternera (Gibco), 0.05ml de antibiótico (10 UI/ml penicilina y 10 µg/ml de estreptomycin), 0.4ml de glutamina (Gibco) y 0.3ml de fitohemaglutinina (Microlab). Se incubó a 37°C.
- 3) A las 48 horas se agregó metrotrexate a una concentración de 40 µg/ml y se incubó a 37°C, después de 17 horas de incubación se lavó dos veces con 5 ml de medio de cultivo McCoy y el botón que se obtuvo se sembró en 5 ml de medio y 50µl de timidina  $1 \times 10^{-3}$  M incubando durante 5.30 horas a 37°C
- 4) Posteriormente se agregó colchicina como inhibidor del huso mitótico (30µg/µl) y se incubó a 37°C durante 15 minutos

- 5) Se centrifugó 10 minutos a 2000 rpm y se descartó el sobrenadante
- 6) El botón se resuspendió con 10 ml de solución hipotónica (Cloruro de potasio 0.075 M) y se incubó 20 minutos a 37°C.
- 7) Se centrifugó 10 minutos a 2000rpm y se descartó el sobrenadante.
- 8) Se resuspendió el botón en solución de Carnoy (metanol:ácido acético 3:1), se hicieron varios lavados hasta que se obtuvo un botón blanco.
- 9) En el último lavado se decantó hasta dejar de 0.5 a 1.0 ml de solución fijadora y el botón se resuspendió. Se dejaron caer varias gotas del botón en portaobjetos limpios y desengrasados, los cuales se dejaron secar al aire y se fijaron a la flama para posteriormente teñirlos con Giemsa

**b). Obtención de bandas G en los cromosomas (Seabright 1971)**

- 1) Las laminillas se sumergieron durante 1 minuto en amortiguador de fosfatos (pH 6.8) ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.025 M y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.025 M) a 37°C que contenía tripsina al 0.02%.
- 2) Posteriormente las laminillas se enjuagaron en cloruro de sodio al 0.9%
- 3) Se procedió a teñir con Giemsa al 2% en amortiguador de fosfatos (pH 6.8) de 4-7 minutos, se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar al aire.
- 4) Los cromosomas se observaron en un microscopio óptico a 100 X y se determinó el cariotipo del paciente, poniendo especial interés en el cromosoma 13 (región 13q14)

**C. Aislamiento del DNA genómico humano a partir de leucocitos de sangre periférica.**

El DNA se obtuvo a partir de leucocitos provenientes de pacientes de retinoblastoma, siguiendo un método previamente descrito (Kempster, 1992) excepto que el DNA se purificó con extracciones fenólicas.

- 1) Se obtuvieron 10 ml de sangre periférica por venipuntura y se mezclaron con 30  $\mu\text{l}$  de EDTA 0.5 M (pH 8.5).
- 2) Las muestras de sangre se centrifugaron a 3,500 rpm durante 15 minutos
- 3) Posteriormente se recuperaron las células blancas de la interfase con una pipeta Pasteur, los eritrocitos remanentes que se encontraban en las células blancas se eliminaron a través de lavados con amortiguador de lisis de eritrocitos (Tris 10mM pH 7.6  $\text{MgCl}_2$  5mM y NaCl 10mM) y se resuspendió vigorosamente
- 4) Se centrifugo a 3,000 rpm durante 10 minutos

- 5) Posteriormente los leucocitos se lisaron agregando 886  $\mu\text{l}$  de NaCl 5mM y 46  $\mu\text{l}$  de SDS al 10% para lisar a las células. Esta mezcla se agitó vigorosamente durante 5 minutos
- 6) Para precipitar las proteínas se adicionaron 308  $\mu\text{l}$  de una solución saturada de NaCl (493  $\mu\text{l}$  de NaCl 5 mM, 154  $\mu\text{l}$  de NaCl saturado) y se centrifugó a 15,000 rpm durante 30 minutos
- 7) Se recuperó el sobrenadante y se le realizaron extracciones fenólicas con fenol-cloroformo-isoamílico (25.24:1) (*Manatis y col 1989*)
- 8) El sobrenadante de la última extracción se transfirió a un tubo estéril y se le adicionaron dos volúmenes de etanol absoluto frío (-20 °C), el DNA se dejó precipitar a -20 °C durante 30 minutos.
- 9) Se separó el DNA y se lavó con etanol al 75%, y se dejó secar a temperatura ambiente.
- 10). Posteriormente se resuspendió en un volumen de 500  $\mu\text{l}$  de agua destilada estéril y se conservó para su análisis a -20 °C.

A todas las muestras obtenidas de DNA se les realizó un análisis espectrofotométrico mediante lecturas a 260 y 280 nm. La concentración del DNA se calculó con la siguiente fórmula:

$$[\text{DNA}], (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (A_{260})(\text{dilución}^{-1})(0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l})$$

sabiendo que 0.05  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de DNA = 1 D.O.<sub>260</sub>

La relación 260/280 indica la pureza del DNA obtenido, se considera que las relaciones comprendidas entre 1.8 y 2.0 unidades de D.O.<sub>260</sub> son las óptimas. Para determinar la integridad de las muestras se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1% en amortiguador de corrida TBE 1x ( Tris Base 54 g, ácido bórico 27.5 g y EDTA 4.65 g disolver y aforar a un litro quedando a una concentración de 10X) y para observar el DNA el gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

#### **D. Aislamiento de DNA genómico humano a partir de tumor de retinoblastoma embebido en bloques de parafina** (*Wright D y col . 1990*)

- 1) Se prepararon cortes del block con el tejido embebido de 5 a 10  $\mu\text{m}$  de grosor y se colocaron en tubos eppendorf esteriles de 1.5 ml

- 2) Se agregaron 200  $\mu$ l de amortiguador de digestión (Tris HCl 50 mM pH 8.5, EDTA 1 mM, Tween 0.5%) y se homogenizó durante 5 minutos.
- 3) El tubo se colocó en un baño maría a 55 °C durante 20 minutos para disolver la parafina y se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente
- 4) Se retiró el anillo de parafina y se homogenizó, posteriormente se agregó proteinasa K a una concentración final de 200  $\mu$ g/ml y se incubó toda la noche a 42°C.
- 5) Se centrifugó a 6,000 rpm durante 5 minutos.
- 6) El sobrenadante se transfirió a un tubo estéril y se incubó a 95°C durante 8 minutos para inactivar la proteinasa K
- 7) Para determinar la integridad del DNA se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1% en amortiguador de corrida TBE 1x y posteriormente el gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/ml).

#### **E. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de 6 regiones del gen Rb1.**

Se hicieron amplificaciones de diferentes regiones del gen Rb1 para determinar si en éstas existen mutaciones que involucren más de 20 pb que son lo suficientemente grandes para observarse en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Se analizaron los exones 3, 8 y 18 los cuales se han reportado más frecuentemente mutados y algunos autores han sugerido que podrían ser puntos calientes dentro del gen Rb1. Los exones 19, 20 que corresponden a las regiones codificadoras del dominio B de la proteína pRB y el exón 23 que codifica para el dominio carboxilo terminal de pRb además tiene dos sitios de fosforilación (*Blanquet y col , 1995, Mancini D y col . 1997*)

Los 6 pares de oligonucleótidos utilizados se co-amplificaron de la siguiente manera: 3/20, 8/18 y 19/ 23. Todas las reacciones de PCR se hicieron bajo las siguientes condiciones: DNA genómico 50-100 ng, 0.2 mM de cada uno de los dNTPs, 2.5 U de Taq polimerasa (Gibco-BRL), 20 pmoles de cada oligonucleótido, amortiguador de PCR (Tris-HCl 20 mM pH 8.4, KCl 50 mM) en un volumen final de reacción de 20 $\mu$ l y por último se agregaron 40 $\mu$ l de aceite mineral. La secuencia de cada oligonucleótido, el tamaño de los productos de amplificación y la temperatura de alineamiento se muestran en la **Tabla II**.

TABLA II

Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las diferentes regiones del gen Rb1

Región	Secuencia del oligonucleótido en dirección 5' → 3'	Tamaño del producto amplificado (pb)
Exón 3se	GcG aat tct aac ata Gta toc aGt GtG tG	239
Exón 3as	GcG aat tcG ttt cct ttt atG Gca GaG G	
Exón 8se	GcG aat tca ttG ttc tta tct aat tta cca c	241
Exón 8as	GcG aat tct aca tct aaa tct act tta act G	
Exón 18se	GcG aat tca att atG ctt act aat GtG G	216
Exón 18as	GcG aat tca Gtt tGa tGG tca aca taa c	
Exón 19se	GcG aat tca act tGa aat Gaa Gac ttt tcc	241
Exón 19as	GcG aat tct aGt ttc aGa Gtc cat Gct c	
Exón 20se	GcG aat tcG act aat ttt tct tat tcc cac	219
Exón 20as	GcG aat tcG aGG aGa Gaa GGt Gaa GtG c	
Exón 23se	GcG aat tca tGt aat GGG tcc acc aaa ac	269
Exón 23as	GcG aat tct tta cta ctt ccc taa aGa	

Secuencia de oligonucleótidos del gen Rb1, utilizados en la amplificación en cadena de la polimerasa. Reportadas por Lohmann D.R y col , (1994) se = oligonucleótido sentido, as = oligonucleótido antisentido.

Todas las regiones se amplificaron bajo las mismas condiciones de PCR, las cuales se indican a continuación:

- 1) Desnaturalización inicial de 94°C durante 5 minutos.
- 2) 35 ciclos de desnaturalización (94 °C, 1 minuto), alineamiento (55 °C, 30 segundos) y extensión (72 °C, 30 segundos).

3) Extensión final 72 °C durante 5 minutos

4) Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% con TBE 1X como amortiguador de corrida teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/ml).

#### **F. Detección de polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP).**

Debido a que en nuestros pacientes no se detectaron mutaciones mediante PCR fue necesario implementar otras metodologías que nos permitieran tratar de identificar mutaciones en el gen. De manera que se procedió a establecer las condiciones necesarias, para realizar la detección de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP) mediante PCR isotópica. El empleo de la técnica de SSCP es de gran ayuda para la búsqueda de mutaciones debido a que el DNA de cadena sencilla tiende a plegarse y formar estructuras complejas estabilizadas por uniones intramoleculares débiles como los puentes de hidrógeno. La movilidad electroforética de estas estructuras en geles desnaturizantes depende no solamente de la longitud de la cadena, sino también de su conformación, la cual está dada por la secuencia nucleotídica (Glavac D y col., 1993). El SSCP es un método muy eficiente para la detección de mutaciones puntuales, debido a que tiene una sensibilidad del 80%, cuando son optimizados los parámetros que afectan la separación de un fragmento de DNA. Glavac D. y col., (1993) estudiaron el efecto de algunos parámetros que alteran la movilidad de las cadenas del DNA y como éstos pueden mejorar la eficiencia del método, tales parámetros fueron temperatura, adición al gel de agentes desnaturizantes, compuestos neutros y cambio en el tamaño del poro dado por la concentración de acrilamida (Glavac D. y col., 1993; Hayashi K y col., 1993).

En el análisis de PCR-SSCP primero se amplifica por PCR una secuencia de DNA, para una detección eficiente del producto se incorpora una marca (isotópica o no isotópica) a la mezcla de reacción del PCR. El producto de amplificación resultante se desnaturiza para disociar las cadenas y se analiza por electroforesis en un gel de poli(acrilamida) (PAGE) (Hayashi K. y col., 1993).

Para la detección de SSCP en este trabajo se realizaron PCR isotópicas bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas a excepción de la dCTP fría, la cual se agregó a una concentración de 0.02 mM, además también se agregó a la mezcla de reacción 2 µCi del isótopo  $\alpha^{32}\text{P}$ -CTP. Para este análisis también se co-amplificaron de la misma manera que para el PCR no isotópico mencionado anteriormente.

Procedimiento:

- 1) Se preparó un gel de poliacrilamida para cada una de las condiciones electroforéticas mostradas en la **Tabla III**.
- 2) Una alícuota de cada una de las muestras amplificadas por PCR isotópico se mezcló con colorante desnaturalizante (formamida 98%, EDTA 10mM, azul de bromofenol 0.1% y xileno cianol 0.1%) en una proporción de un volumen de muestra por medio volumen de colorante
- 3) Las muestras se desnaturalizaron a 100°C durante 10 minutos e inmediatamente se sumergieron en agua helada, es muy importante mantenerlas en estas condiciones para evitar que las cadenas de DNA se renaturalizen
- 4) Se colocaron 5 µl de cada una de las muestras en cada pozo del gel y se sometieron a electroforesis utilizando como amortiguador TBE 1x, el tiempo de electroforesis se indica en la tabla III. Es importante resaltar que estas condiciones de electroforesis son adecuadas para fragmentos de ~ 215-270 pb de las regiones en estudio del gen Rb1.
- 5) Después de transcurrido el tiempo de electroforesis el gel se secó con vacío a 80°C, posteriormente se expuso a una película de rayos X (Kodak Ektascan EM-1) y se guardó a -70°C. El tiempo de exposición dependió de la actividad del isótopo

TABLA III

Diferentes condiciones de electroforesis que se implementaron para la determinación de los SSCP's.

	Poliacrilamida 8%	Poliacrilamida 8% + glicerol 10%	Poliacrilamida 6%	Poliacrilamida 6% + glicerol 10%
Poliacrilamida 40%	10 ml	10 ml	7.5 ml	7.5 ml
TBE 5X	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Urea	21g	21g	21g	21g
Glicerol	-	5 ml	-	5 ml
Agua	15 ml	10 ml	17.5 ml	12.5 ml
Persulfato de amonio	0.4 ml	0.4 ml	0.4 ml	0.4 ml
TEMED	30µl	30µl	30µl	30µl
Volumen final	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml
Watts de corrida	20	30	20	30
Tiempo de electroforesis	5 horas	7 horas	5 horas	7 horas

TEMED: N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina

En todos los casos la electroforesis se realizó a 4°C.

### G. Secuenciación del DNA.

La secuenciación del DNA usando terminadores marcados es un método rápido y conveniente para desarrollar las reacciones de extensión enzimática. Los beneficios de este método incluyen:

- Las reacciones se llevan a cabo en un solo tubo
- No se necesita desnaturalización alcalina para DNA de doble cadena.
- Se utiliza el mismo protocolo para fragmentos de DNA de cadena sencilla o doble.
- Se necesita menos cantidad del templado.
- Se obtienen resultados más reproducibles

En este trabajo se utilizó el Kit BigDye (Perkin Elmer), este kit contiene la enzima AmpliTaq<sup>®</sup> DNA Polimerasa, FS. Esta enzima es una variante de la DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* que contiene una mutación puntual en su sitio activo, esto da como

resultado una menor distinción contra los dideoxinucleótidos. Además esta enzima también tiene una segunda mutación en el dominio amino terminal que elimina la actividad de exonucleasa de 5' → 3'.

Los Biosistemas PE Applied han desarrollado un grupo de terminadores con una marca nueva de alta sensibilidad. Las estructuras de las marcas nuevas contienen una marca donadora fluoresceína, por ejemplo, 6-carboxifluoresceína (6-FAM), unida a una marca aceptora diclororodamina (dRodamina). El máximo de excitación de cada marca es la de la fluoresceína donadora, y el espectro de emisión el del aceptor rodamina.

La marca donadora está optimizada para absorber la energía de excitación del ión argón del láser en los instrumentos de secuenciación automática de DNA. La unión proporciona transferencia extremadamente eficiente de energía (eficiencia cuántica cerca del 1.0, p. e., 100%) entre las marcas donadora y aceptora. Los terminadores BigDye™ son 2 a 3 veces más brillantes que los terminadores normales.

Además los terminadores nuevos BigDye también tienen un espectro de emisión más estrecho que los terminadores normales, dando un menor solapamiento de espectros y menos interferencia. La señal más brillante y la disminución de la interferencia generalmente mejora la sensibilidad de 4 a 5 veces.

Procedimiento:

Se realizó amplificación por PCR como se comentó anteriormente en las regiones de DNA de pacientes que mostraron alguna variación en la migración electroforética detectada por SSCP.

a). Purificación de los productos de PCR.

La purificación de los fragmentos se realizó de la siguiente manera: Todo el producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). Posteriormente se cortó el pedazo de agarosa que contenía el fragmento de DNA, la agarosa se colocó dentro de un microtubo, se sumergió en nitrógeno líquido durante 10 minutos y se centrifugó 5 minutos a 15,000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se le hicieron extracciones fenólicas, la última extracción se realizó con cloroformo-isoamilico (24:1) y la fase superior se transfirió a otro tubo y se precipitó con etanol absoluto, la pastilla se resuspendió en 30 µl de agua destilada. Para determinar la concentración, integridad y pureza del fragmento purificado, se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) utilizando TBE 1X como amortiguador de corrida

**b). Extensión de la cadena.**

Para cada reacción se agregaron; 8µl de mezcla de reacción con los terminadores (Perkin-Elmer), 30 ng/µl del producto de PCR purificado, 20 pmol del oligonucleótido del exón que se analizó y se llevó a un volumen final de reacción de 20µl con dH<sub>2</sub>O. La amplificación de la cadena se llevó a cabo en las mismas condiciones anteriormente mencionadas en el PCR no isotópico.

**c). Purificación de los productos de extensión.**

Se llevó a cabo usando columnas Centri-Sep (Princeton Separations), La columna previamente hidratada 2 horas antes con 0,8 ml de agua grado reactivo se centrifugó 3,000 rpm durante 3 minutos para eliminar el fluido, posteriormente se agregó la mezcla de reacción (20µl) BigDye en la parte superior del gel de la columna. La columna se colocó en un tubo colector de la muestra y se centrifugó 3,000 rpm durante 3 minutos, la muestra purificada se recibió en el tubo colector y se secó en una centrifuga con vacío. La muestra seca se disolvió en 2 µl de una mezcla que contenía formamida desionizada y un amortiguador (EDTA 25 mM, pH 8.0 y azul dextran 50 mg/ml) en una proporción 5:1. Las muestras se desnaturalizaron a 90°C durante 5 minutos e inmediatamente se colocaron en hielo.

**d). Electroforesis en geles de secuenciación.**

Las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida preparado de la siguiente manera.

- 1) Para un volumen de 50 ml se agrega lo siguiente; 18 g de urea (Promega), 5.625 ml de poliacrilamida (acrilamida 40 % + bisacrilamida en una proporción 19:1), 28 ml de agua, 0.5 mg de amberlita para desionizar y se dejó agitando durante 10 minutos. Posteriormente se agregaron 5 ml de amortiguador 10X (EDTA, Tris/Acido bórico) previamente filtrado.
- 2) Esta mezcla se filtró, se agitó y se desgasificó con bomba de vacío para eliminar el oxígeno.
- 3) Se agregaron 250 µl, de los catalizadores (0.5 mg de persulfato de amonio + 500 µl de agua) el cual se preparó en el momento.
- 4) Se agitó suavemente y se agregaron 30 µl de TEMED se mezcló suavemente y se procedió a llenar la cámara de electroforesis.
- 5) Se procedió a colocar las muestras en los pozos y someterlas a electroforesis a 3 W durante toda la noche.

6) Las reacciones de secuenciación se analizaron en un secuenciador ABI PRISM 377 (Applied Biosystems).

## **H. Inmunohistoquímica de la proteína pRb**

### **a). 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 XXXI.

La pieza ocular con retinoblastoma se fijó en solución de formaldehído al 10% en amortiguador de fosfatos ( $\text{NaHPO}_4$ , 0.4% y  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , 0.65%), posteriormente las muestras se deshidrataron en etanol al 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 (Gibco-BRL).

### **b). Inmunohistoquímica de la pRb en retinoblastoma**

Para asegurar la integridad del tejido, uno de los cortes de la serie se tiñó con Hematoxilina-Eosina (HE). La valoración de la expresión de la proteína a estudiar se llevó a cabo utilizando el anticuerpo monoclonal Ki-67 específico anti-pRb. Para visualizar la presencia de la proteína, se utilizó el sistema DAKO-ENVISION, el cual produce una señal más intensa que el sistema peroxidasa-anti-peroxidasa clásico, debido a que este sistema utiliza un polímero sintético que contiene más de 4 moléculas de peroxidasa unido a un anticuerpo primario. El anticuerpo monoclonal Ki-67 (1:50; DAKO Co.) anti está pRb dirigido contra 15 aminoácidos del dominio carboxilo terminal de la proteína pRb, éste se usó como un marcador de proliferación celular. Este anticuerpo reacciona con células en todas las etapas el ciclo celular, excepto las que están en fase G0. La reacción con este anticuerpo sirve como un indicador de la fracción celular en crecimiento, esto es el número de células que se están dividiendo. El revelado se lleva a cabo por el método enzimático estándar de peroxidasa Diaminobencidina (DAB), el cual produce un precipitado insoluble de color café en el sitio donde se encuentre la proteína.

A continuación se describe brevemente el desarrollo de esta técnica.

- 1) Los portaobjetos con el tejido embebido en parafina se incubaron a 60°C durante 30 minutos con la finalidad de eliminar la parafina.
- 2) Las laminillas conteniendo los cortes se sumergieron en xilol durante 5 minutos (2 veces)

- 3) Posteriormente se hidrataron pasando el tejido en etanol a diferentes concentraciones (100%, 90%, 70% y 30% durante 5 minutos cada uno).
- 4) Las laminillas se sumergieron en PBS por 5 minutos
- 5) Posteriormente se trataron con  $H_2O_2$  al 3% incubando 30 minutos
- 6) Se lavó sumergiendo en PBS durante 5 minutos.
- 7) Se agregó suero de burro al 10% para bloquear y se dejó por 30 minutos.
- 8) Se eliminó el suero y se agregó el anticuerpo primario, se continuó incubando durante 1 hora en cámara húmeda.
- 9) Las laminillas se lavaron en PBS tween 0.025% por 5 minutos.
- 10) Posteriormente se lavaron en PBS por 5 minutos.
- 11) Se agregó el polímero DAKO ENVISION y se incubó por 30 minutos en cámara húmeda
- 12) La reacción se reveló usando 6 mg de DAB en 10 ml de PBS con 100  $\mu$ l de  $H_2O_2$  al 3%
- 13) Se detuvo la reacción sumergiendo las laminillas en agua durante 3 minutos
- 14) La Contratinción se realizó con Hematoxilina de Harris.
- 15) Se deshidrató en etanol a diferentes concentraciones (30%, 70%, 90% y 100%, durante 5 minutos cada uno).
- 16) Se incubó en xilol 2 minutos posteriormente se agregó una gota de resina sobre el tejido y se colocó encima un cubreobjetos.

Se incluyeron controles para la reacción de especificidad de la proteína pRb, estos se usaron como sigue: 1) La línea celular Saos-2 de osteosarcoma que tiene una eliminación homocigota del gen  $Rb1^{-/-}$  no expresa la proteína pRb, ésta sirvió como control negativo. Después de la transfección con el cDNA del gen  $Rb1$  esta misma línea celular se utilizó como control positivo

#### c). 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. El análisis semicuantitativo de la intensidad de la reacción de inmunotinción fue clasificada de acuerdo a lo reportado previamente por Terpe y cols (1994) y Simon y cols (1996) Sólo fue evaluado el epitelio que mostrara lesión patológica - ausencia de tinción

## VI. RESULTADOS

En las **Tablas 4 y 5** se resumen las características generales de los pacientes estudiados, así como el resultado del cariotipo que se les realizó. A los pacientes con retinoblastoma que tienen antecedentes familiares de esta neoplasia se les elaboró el árbol genealógico, mostrados en la **Figura 5**.

Mediante el análisis de los árboles genealógicos de las 19 familias con retinoblastoma estudiadas, se identificaron 16 sin antecedentes familiares ( de éstas el caso índice en 11 presentó retinoblastoma unilateral y en 5 fue bilateral), y 3 con antecedentes familiares de la neoplasia (de éstas el caso índice en 2 presentó retinoblastoma bilateral y 1 unilateral) De los pacientes estudiados 8 corresponden al sexo femenino y 11 al sexo masculino, y la edad al diagnóstico de la neoplasia fué en promedio a los 34 meses

### A. Estudio citogenético

El estudio citogenético se realizó cuando fue posible en los individuos afectados y familiares de primer grado, en total se analizaron 10 casos índice y 6 familiares de primer grado (**Tabla 4**).

Se observaron 20 metafases de cada individuo eligiendo las que presentaban mediana o alta resolución, dando mayor importancia a la observación del cromosoma 13 en la región 13q14.2. En ninguno de los casos analizados (**Tabla 4 y 5**) se presentó alguna alteración cromosómica en la región 13q14.2, que pudiera observarse al microscopio óptico.

En la **Figura 6** se muestra el cariotipo de un paciente con retinoblastoma bilateral (familia Rb-14), en donde el par de cromosomas 13 no tienen alteraciones estructurales evidentes. Únicamente el caso índice de la familia Rb-3 (tabla 5) presentó un complemento cromosómico anormal además de un polimorfismo en el cromosoma 1, su complemento cromosómico fue 47, XXY, var (1)(q12 GTG 44), var (1)(q12 GTG 14)

Tabla 4. Datos generales de los pacientes con antecedentes heredofamiliares de la neoplasia.

Familia	Caso	Edad al Dx años, meses	Sexo	Tipo de Rb	Cariotipo
Rb-7	Indice	3 6/12	M	Bilateral	*
	Madre	infancia	F	Bilateral	46,XX
Rb-13	Indice	2 9/12	F	Bilateral	46,XX
	Madre	Infancia	F	Unilateral	*
Rb-16	Indice	4	M	Unilateral	46,XY
	Hermano	4	M	Unilateral	46,XY
	Hermano	3	M	Unilateral	46,XY
	Padre	Sin Rb	M	**	46,XY
	Madre	Sin Rb	F	**	46,XX

\* No se dispuso de muestra para realizar el cariotipo

\*\* No desarrollaron la neoplasia.

Edad = años

F = Femenino

M = Masculino

Dx = Diagnostico

Tabla 5. Datos generales de los pacientes sin antecedentes heredofamiliares de la neoplasia.

Familia	Caso	Edad al Dx años, meses	Sexo	Tipo de Rb	Cariotipo
Rb-1	Índice	6	F	Unilateral	46,XX
Rb-2	Índice	2 5/12	M	Bilateral	46,XY
Rb-3	Índice	9/12	M	Bilateral	**47,XXY
Rb-4	Índice	2 4/12	F	Unilateral	46,XX
Rb-5	Índice	9	M	Unilateral	46,XY
Rb-6	Índice	1 6/12	F	Unilateral	46,XX
Rb-8	Índice	4 6/12	F	Unilateral	*
Rb-9	Índice	1 1/12	M	Unilateral	*
Rb-10	Índice	1	M	Unilateral	*
Rb-11	Índice	7/12	M	Bilateral	46,XY
Rb-12	Índice	2 2/12	F	Unilateral	*
Rb-14	Índice	2 5/12	M	Bilateral	46,XY
Rb-15	Índice	1 2/12	M	Bilateral	*
Rb-17	Índice	4	F	Unilateral	*
Rb-18	Índice	3	M	Unilateral	*
Rb-19	Índice	5 5/12	F	Unilateral	*

F = Sexo femenino

M = Sexo masculino

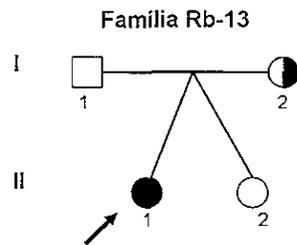
\* No se dispuso de muestra para realizar el cariotipo

\*\*\* El paciente Rb-3 presentó un complemento cromosómico 47, XXY, var (1)(q12 GTG 44), var (1)(q12 GTG 14).

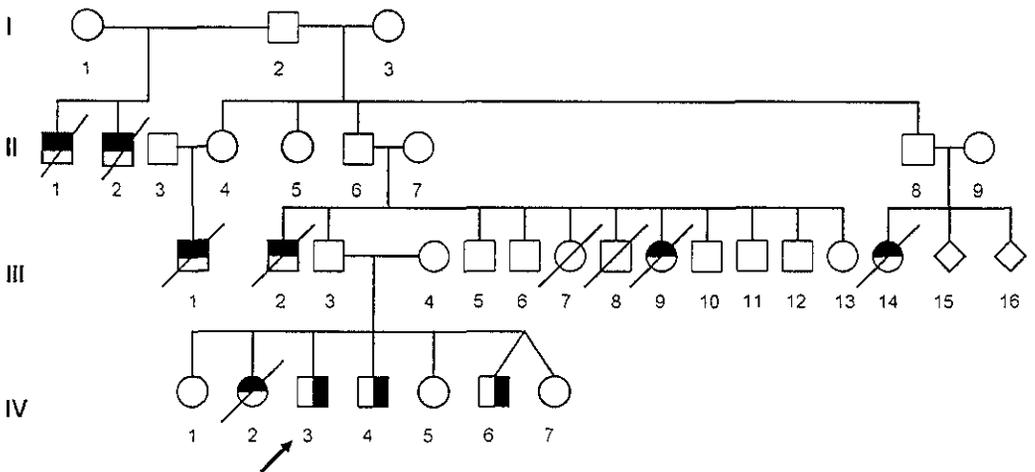
Edad = años

Dx = Diagnóstico

a)

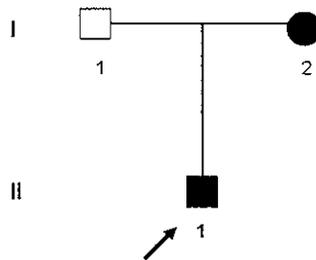


b)

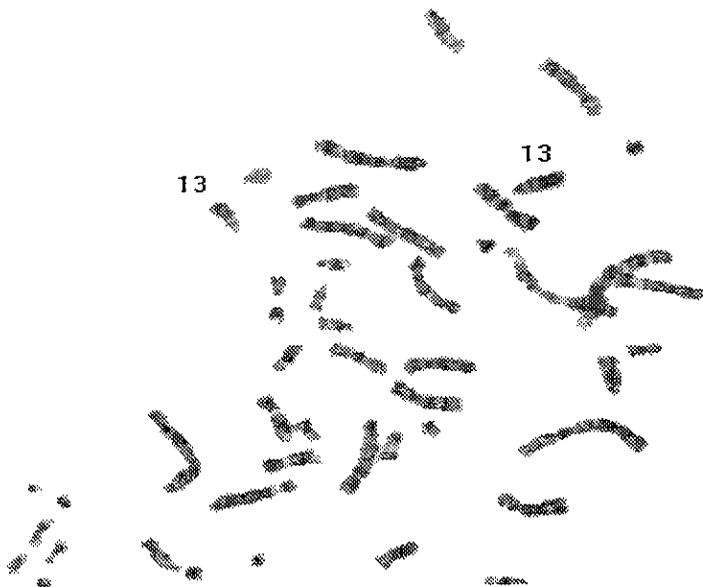
**Familia Rb-16**

c)

## Familia Rb-7



**Figura 5.** Arboles genealógicos de las familias que presentaron antecedentes familiares de retinoblastoma. Caso índice  Retinoblastoma unilateral    
 Retinoblastoma bilateral   Individuos que fallecieron por causa diferente a retinoblastoma   No se tiene la información del tipo de retinoblastoma que padecen (unilateral o bilateral)   Sexo no especificado. 



**Figura 6.** Metafase que representa el complemento cromosómico del caso índice de la familia Rb-14 el cual se reporta como 46, XY Al microscopio óptico se observan normales los cromosomas 13, la obtención del cariotipo se realizó de acuerdo a lo descrito en Sujetos y Métodos Aumento 100X

## B. Estudio molecular

a). Búsqueda de mutaciones en el DNA de pacientes con retinoblastoma mediante co-amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se realizó la detección de mutaciones en el gen Rb1 de 19 pacientes no emparentados con retinoblastoma bilateral o unilateral. El DNA de linfocitos y de tumor se analizó mediante co-amplificación por PCR, para lo cual se utilizaron pares de oligonucleótidos que amplifican los exones de los dominios funcionales B y carboxilo terminal de la proteína como se menciona en Sujetos y Métodos (*Blanquet V y col., 1995, Mancini D y col., 1997*)

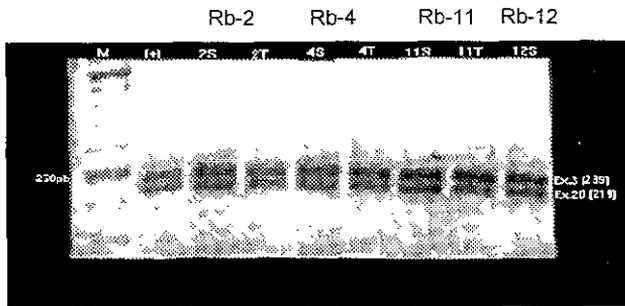
Antes de realizar la amplificación por PCR, se verificó que las muestras de DNA cumplieran con los requerimientos necesarios para este estudio. Las concentraciones de DNA obtenidas fueron suficientes ya que se obtuvo en promedio de 200 a 400 ng/ $\mu$ l, la pureza fué de 1.7 a 2.0 unidades de absorbancia y el DNA que se obtuvo a partir de linfocitos de sangre periférica no mostró degradación después de la extracción como se observó en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio como se indica en Sujetos y Métodos. Sin embargo, las muestras de DNA extraído a partir del tejido tumoral, mostraron una ligera degradación que se observó en el gel de agarosa, esto no afectó los estudios posteriores que se realizaron.

Inicialmente se probó que cada uno de los oligonucleótidos funcionara de manera individual, posteriormente, se hicieron reacciones de PCR combinando varios pares de estos para amplificar más de un exón a la vez. Las combinaciones se hicieron tomando en cuenta el tamaño de los productos amplificados con la finalidad de distinguir el producto de cada reacción. Algunas combinaciones no funcionaron correctamente, ya que se obtuvieron bandas inespecíficas o la ausencia de los productos de amplificación esperados. Finalmente se eligieron las combinaciones que co-amplificaron los exones 3/20, 8/18 y 19/23, en todos los casos se obtuvieron los productos de amplificación esperados, según sus pesos moleculares

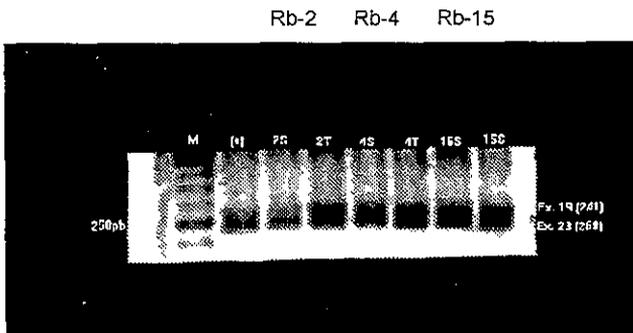
En la **Figura 7** se observan los productos de la co-amplificación de los exones analizados (3/20, 8/18 y 19/23) que fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. En la **Figura 7A** se observa la co-amplificación de los exones 3 y 20 del DNA obtenido a partir de sangre periférica y tumor de 3 pacientes con retinoblastoma. En la **Figura 7B** se observa la co-amplificación del DNA obtenido a partir de sangre periférica y de tumor de los exones 19 y 23 de 3 pacientes con retinoblastoma y en la **Figura 7C** se observa la co-amplificación de los exones 8 y 18 del DNA obtenido a partir de sangre periférica y tumor de 3 pacientes. En cada uno de los casos se incluyó el producto de

amplificación de un individuo sin retinoblastoma (control positivo). Mediante este análisis no fue posible detectar algún tipo de mutación en ninguno de los pacientes analizados.

7A



7B



7C

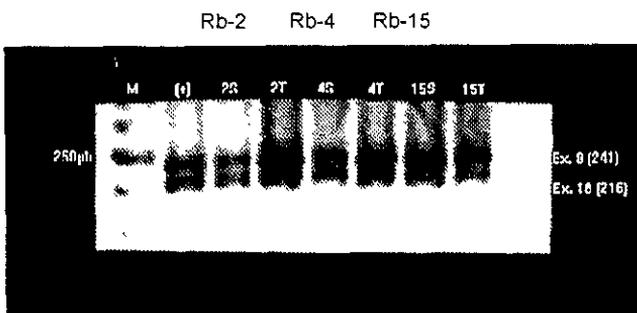


Figura 7. Coamplificación por PCR de diferentes exones del gen Rb1. Se muestra la coamplificación del DNA de linfocitos y/o tumor de 5 pacientes con retinoblastoma, como se describe en Sujetos y Métodos. Una alícuota de 3 $\mu$ l del producto coamplificado, se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. En A se muestra la co-amplificación de los exones 3/20, en B los exones 19/23 y en C los exones 8/18. En todas las reacciones se incluyeron: un control positivo (+) y un marcador de peso molecular (M) (escalera de 50pb Gibco-BRL). S = DNA extraído de sangre periférica, T = DNA extraído de tumor, el número corresponde al caso del paciente con retinoblastoma.

#### b). Detección de polimorfismos mediante SSCP

Se establecieron las condiciones que permitieron mantener desnaturalizadas durante la electroforesis las dos cadenas de DNA amplificadas de los diferentes exones del gen Rb1. Para esto se probaron diferentes condiciones de electroforesis descritas en Sujetos y Métodos. En la **Figura 8** se muestra la amplificación del exón 8 del gen Rb1 de un individuo no afectado por retinoblastoma, observándose las dos cadenas de DNA separadas. Una vez establecidas las condiciones de electroforesis para SSCP se procedió a someter las muestras de los pacientes a estas condiciones.

Las muestras de DNA de los pacientes (linfocitos y tumor) además se co-amplificaron mediante PCR isotópico utilizando 2  $\mu\text{Ci}$  del isótopo  $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -CTP.

En los casos índice de las familias Rb-2, Rb-8 y Rb-12 se detectaron polimorfismos mediante la técnica de SSCP, (**Figura 9**). En todos los casos se incluye un control sin polimorfismo cuyo patrón de migración sirve de referencia.

El producto de amplificación del DNA de tumor del paciente Rb-2 mostró un polimorfismo en el exón 8 ya que su patrón de migración es diferente al producto de amplificación del DNA de un individuo sano (**Figura 9A**).

En el paciente Rb-8 la muestra amplificada corresponde a DNA extraído de linfocitos de sangre periférica, el producto de amplificación con el polimorfismo correspondió al exón 20 (**Figura 9B**).

En el caso del paciente Rb-12 el DNA se obtuvo del tumor y la región que mostró el polimorfismo corresponde al exón 18 (**Figura 9C**). Es importante mencionar que se logró detectar los polimorfismos a diferentes condiciones de electroforesis ya que en algunos casos como en el paciente Rb-2 el polimorfismo se observó cuando se llevó a cabo la electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% + glicerol al 10% y en las otras condiciones mencionadas en la tabla 2 no se detectó éste, como se observa en la **Figura 9B** en donde las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 6% con glicerol al 10%. En el paciente Rb-8 se observó el polimorfismo en todas las condiciones probadas y la que se muestra en la **Figura 8C** corresponde a una electroforesis realizada en un gel de poliacrilamida al 8% + glicerol 10%, en este caso fue más evidente el polimorfismo detectado que en el resto de las condiciones electroforeticas para el paciente Rb-8.

El resto de los pacientes analizados mediante esta metodología no mostró algún polimorfismo en las regiones del gen Rb1 que se analizaron (**Tabla 6 y 7**).

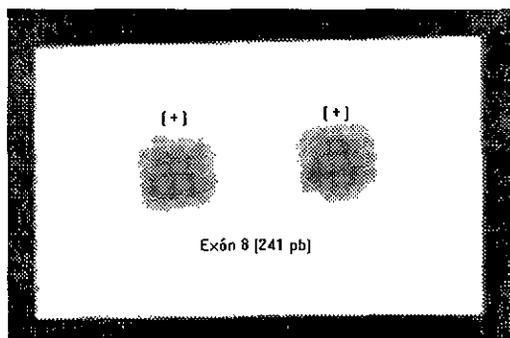
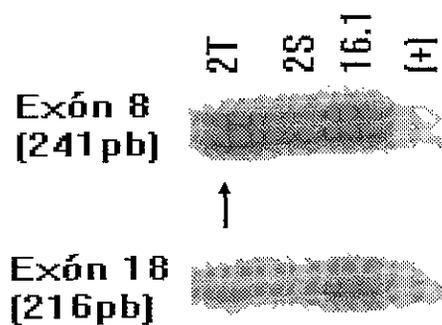
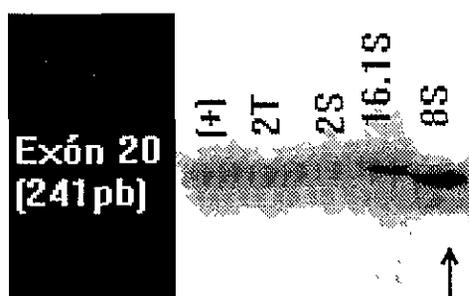


FIGURA 8. SSCP isotópico del exón 8. Autorradiografía de un gel de poliacrilamida al 8% en donde se muestra la amplificación del exón 8 del gen Rb1 de un individuo sano = (+)

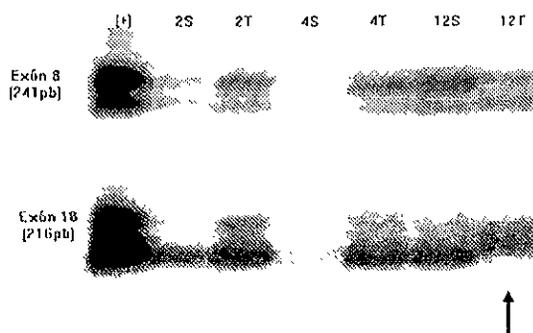
9A



9B



9C



**Figura 9.** Detección de polimorfismos mediante SSCP en individuos con retinoblastoma. La extracción de DNA de linfocitos y de tumor se realizó como se describe en Sujetos y Métodos. Alícuotas de DNA de cada afectado se coamplificaron y 2 $\mu$ l del producto de PCR se sometieron a electroforesis en poliacrilamida, como se describe en Sujetos y Métodos. En **9A** se muestra el análisis de SSCP de los exones 8 y 18 del gen Rb1 de pacientes con retinoblastoma, la autoradiografía corresponde a un gel de poliacrilamida al 8% + glicerol al 10%. En **9B** se muestra el análisis de SSCP del exón 20 del gen Rb1 de pacientes con retinoblastoma, la autorradiografía corresponde a un gel de poliacrilamida al 8% + glicerol 10%. En **9C** se muestra el análisis de SSCP de los exones 8 y 18 de pacientes con retinoblastoma, la autoradiografía corresponde a un gel de poliacrilamida al 6% + glicerol al 10%. (+) = control sin polimorfismos en el gen Rb1,  $\uparrow$  = banda polimórfica

**Tabla 6. Resultados de SSCP de los pacientes con antecedentes heredofamiliares de la neoplasia.**

Paciente	SSCP de los exones: 3, 8, 18, 19, 20 y 23	Tejido analizado	Tipo de Rb
Rb-7	NDP	Sangre	Bilateral
Rb-13	NDP	Sangre	Bilateral
	NDP	Tumor	
Rb-16	NDP	Sangre	Unilateral

NDP = No se detectó polimorfismo en el gen Rb1 de los tejidos analizados

Rb-7...Rb-16 los números indican la familia a la que pertenece el caso índice

Rb = retinoblastoma

**Tabla 7. Resultados de SSCP de los pacientes con retinoblastoma sin antecedentes heredofamiliares de la neoplasia.**

Paciente	SSCP de los exones 3, 8, 18, 19, 20 y 23	Tejido analizado	Tipo de Rb
Rb-1	NDP	Sangre	Unilateral
Rb-2	Exón 20 (+) Exón 8 (+)	Sangre Tumor	Bilateral
Rb-3	NDP	Tumor	Bilateral
Rb-4	NDP NDP	Sangre Tumor	Unilateral
Rb-5	NDP NDP	Sangre Tumor	Unilateral
Rb-6	NDP	Sangre	Unilateral
Rb-8	Exón 20 (+)	Sangre	Unilateral
Rb-9	NDP	Sangre	Unilateral
Rb-10	NDP	Sangre	Unilateral
Rb-11	NDP NDP	Sangre Tumor	Bilateral
Rb-12	NDP Exón 18 (+)	Sangre Tumor	Unilateral
Rb-14	NDP	Sangre	Unilateral
Rb-15	NDP NDP	Sangre Tumor	Bilateral
Rb-17	NDP	Sangre	Unilateral
Rb-18	NDP	Sangre	Unilateral
Rb-19	NDP	Sangre	Unilateral

NDP = No se detectó polimorfismo en el gen Rb1 de los tejidos analizados. Rb-1 . Rb-19 los números indican la familia que pertenece el caso índice. Rb = Retinoblastoma (+) = Se identificó un polimorfismo en el exón indicado.

c). Secuenciación de los productos de amplificación del gen Rb1 que mostraron algún polimorfismo detectado por SSCP.

Después de analizar las muestras de DNA de 19 pacientes con retinoblastoma mediante co-amplificación por PCR no isotópica y SSCP-isotópico, se eligieron para secuenciación las muestras de DNA que mostraron algún polimorfismo detectado por SSCP. Para esto primero se amplificó el exón de la muestra de DNA, el producto se purificó y se reamplificó mediante PCR asimétrico utilizando el Kit BigDye (Perkin Elmer), como se describe en Sujetos y Métodos.

En la **Figura 10A** se muestra la secuencia del exón 8 del paciente Rb-2, que presenta una mutación puntual que se generó por la inserción de una adenina en el codón 304 del cDNA del gen Rb1 (**Tabla 8**). Esta mutación provocó un cambio de una asparagina por una lisina, en el aminoácido 304 de la proteína. La adición del nucleótido generó un codón de paro en la posición 316 del cDNA en el exón 8. En este mismo paciente también se detectó otra mutación en el exón 20, el tipo de mutación fue una transversión de una guanina por una timina en el codón 704 del cDNA del gen en estudio. Esta mutación generó un cambio de una alanina por una serina en el aminoácido 704 (**Figura 10B**).

La secuenciación del polimorfismo identificado en el exón 20 del individuo Rb-8, se muestra en la **Figura 10C**. Se encontró una eliminación de una timina en la posición 702 del cDNA, que corrió el marco de lectura generando un codón de paro en la posición 707 del cDNA (**Tabla 8**). La secuenciación del polimorfismo encontrado en el exón 18 del paciente Rb-12 se muestra en la **Figura 10D**. Se encontraron dos mutaciones en esta región, la primera es una eliminación de una timina en el codón 613 del cDNA, esta mutación generó que se corriera el marco de lectura ocasionando el cambio de una serina por una histidina en la posición 613 de la proteína pRb, además esta mutación generó un codón de paro en la posición 656 del exón 19. La segunda mutación que se observó fue un polimorfismo, debido a que el cambio de una timina por una guanina en el exón 18 generó un codón con sentido (**Tabla 8**).

**Tabla 8. Mutaciones identificadas en pacientes con retinoblastoma.**

	Paciente 2-Rb	Paciente 2-Rb	Paciente 8-Rb	Paciente 12-Rb	Paciente 12-Rb
Origen del DNA	Tumor	Tumor	Sangre	Tumor	Tumor
Exón mutado	8	20	20	18	18
Tipo de mutación	inserción	transversión	eliminación	eliminación	transversión
Nucleótido involucrado	adenina	guanina	timina	timina	timina
Codón mutado	aac → aaa, c	gcc → tcc	tat → tac	tca → cac	ctt
Aminoácido involucrado	Asn → Lys	Ser → Ala	Tyr → Tyr	Ser → His	Leu → Leu
Posición del codón mutado	304 del cDNA	704 del cDNA	702 del cDNA	613 del cDNA	640 del cDNA
Codón de paro	316 del cDNA	No	707 del cDNA	656 del cDNA	No

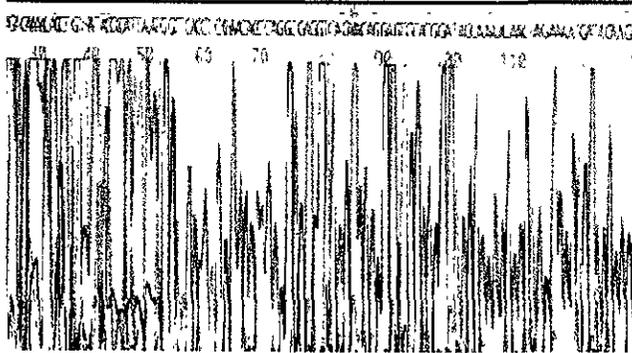
10A

3' . GGCGAGGTCAGAAACAGGAGT...5'

Exón 8



Codón 304



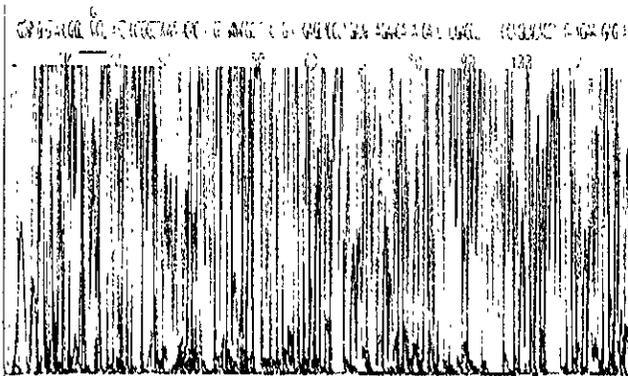
10B

3'TGTATCGGCTAGCCTATC...5'

Exón 20



Codón 704



10C

3'TGTATCGGCTAGCCTATC .5'

↑ Exón 20

Codón 702



10D

3'GATCACCTTTATTTGATCTTATTA .5'

↑ Exón 18

Codón 813



**Figura 10.** Secuenciación de los exones que mostraron polimorfismo. Las muestras que presentaron alguna variación en la migración, con respecto al control durante la electroforesis en geles de poliacrilamida con el método de SSCP, se sometieron a secuenciación como se describe en Sujetos y Métodos. En **10A** se observa la secuencia del exón 8 del paciente 2-Rb. En **10B** se muestra la secuencia del exón 20 del mismo paciente. En **10C** secuencia del exón 20 del paciente 8S-Rb. En **10D** secuencia del exón 18 del paciente 12-Rb. Los \* y ↑ indica la posición de la mutación. En cada una de las figuras se muestra la secuencia normal del exón y se indica la posición de la mutación.

### C. Análisis inmunohistoquímico para la proteína pRb en retinoblastomas.

#### a). Detección de la pRb en retinoblastoma

La detección inmunohistoquímica de la proteína pRb se realizó en cortes histológicos de 8 retinoblastomas, 4 de ellos provinieron de individuos afectados bilateralmente y 4 de individuos con retinoblastoma unilateral (Tabla 9). De los tumores estudiados, 3 provenían de pacientes femeninos y 6 de pacientes masculinos. Como control positivo se utilizó la línea celular Saos-2 transfectadas con el gen Rb1, en la cual se observa tinción positiva para la proteína pRb (++++)(Figura 12) y una retina (sin retinoblastoma) de un individuo masculino de 4 años de edad (Figura 14). Como control negativo se utilizó la línea celular Saos-2 Rb<sup>-/-</sup> sin transfectar (Figura 13).

#### b). Patrón de tinción de la retina normal

En la Figura 14 se muestra el corte histológico del ojo normal observándose la retina en la cual se realizó la inmunohistoquímica para detectar la proteína pRb. La porción *a* corresponde a los segmentos externos o fotosensibles que son prolongaciones sinápticas de células fotorreceptoras, formadas de conos y bastones, esta capa no presenta núcleos por lo que no se observó tinción positiva para la proteína pRb. La capa nuclear externa *b* presentó tinción heterogénea de los núcleos de conos y bastones (Tabla 10) los cuales se tiñeron en su mayoría con Hematoxilina y por lo tanto fueron negativos para la detección de la proteína pRb, además también se observaron algunos núcleos que presentaron mediana tinción positiva (++) para pRb con respecto al control positivo (línea celular Saos-2 transfectadas con el gen Rb1) (Figura 10). En *c* se observa la capa plexiforme externa que no presenta núcleos, es el punto donde hacen sinapsis los fotorreceptores con las dendritas de las células bipolares. La capa *d* corresponde a la nuclear interna que contiene los núcleos de las células gliales de Müller y los de neuronas horizontales o amácrinas en donde se observan algunos núcleos con tinción negativa (-) para la proteína pRb y la mayoría de éstos fueron positivos para la misma encontrando desde tinción mediana (++) a intensa (+++). En *e* se observa la capa plexiforme interna anucleada, es la región de contacto o intercambio sináptico entre células bipolares, amácrinas y ganglionares. En *f* se muestra la capa de células ganglionares que tiene los núcleos de estas células y vasos retinianos en la cual existen, pocos núcleos que en su mayoría mostraron tinción débil (+) para la proteína pRb y algunos, mostraron tinción negativa (-)

### c). Patrón de tinción en retinoblastomas

En las Figuras 15 a 18, se observan la inmunotinción de algunos retinoblastomas con diferentes grados de diferenciación.

En la Tabla 9 se observa que en los 8 tejidos tumorales analizados presentaron diferentes grados de diferenciación, los cuales fueron: tumor diferenciado en rosetas de Flexner Wintersteiner (casos Rb-2, Figura 15 y caso Rb-17, Figura 16), tumor medianamente diferenciado (casos Rb-3 y Rb-15) y tumor indiferenciado (casos Rb-4, Rb-5, Rb-11 y Rb-18 Figura 18)

#### 1) Tumores bien diferenciados.

En el caso índice de la familia Rb-2 que presentó retinoblastoma bilateral se identificaron dos mutaciones en el gen Rb1 una de ellas en el exón 8 y la otra en el 20, ambas mutaciones se identificaron en el DNA del tumor. El tumor de este paciente presentó rosetas de Flexner Wintersteiner y el patrón de tinción para la proteína fué negativo indicando que la proteína no se encuentra en este tumor (Figura 15). El caso índice de la familia Rb-17 corresponde a un retinoblastoma unilateral, este caso también presentó diferenciación en rosetas de Flexner Wintersteiner, además no se identificó ninguna mutación en los exones analizados, el patrón de tinción para la proteína que va de mediana tinción (+++) a tinción intensa (++++) con respecto al control (línea celular Saos-2 transfectada con el gen Rb1) indica que pRb se encuentra presente en el tumor (Figura 16). Este caso (Rb-17) se utilizó como control negativo interno para la inmunotinción el cual se muestra en la Figura 17.

#### 2) Tumores medianamente diferenciados:

En el caso índice de la familia Rb-3 que presentó retinoblastoma bilateral no había una diferenciación total del tumor ya que se observaron células dispersas en el tejido y pocas rosetas de Flexner Wintersteiner, en este tumor se observó desde tinción débil (++) hasta ausencia de la misma (-) en comparación al control negativo. El caso índice de la familia Rb-15 también presentó retinoblastoma bilateral, el tumor no estaba completamente diferenciado y solo se observaron algunas células arregladas en rosetas, en la inmunotinción se observó tinción mediana (++) , débil (+) y células que fueron negativas (-), (figura no mostrada). El estudio molecular en este paciente indicó que no existe mutación en los exones analizados

### 3) Tumores indiferenciados:

Los casos índice de las familias que presentaron este tipo de tumor fueron Rb-4, Rb-5, Rb-11 y Rb-18, de estos sólo el caso 11 presentó retinoblastoma bilateral y el resto fue unilateral. Los tres primeros presentaron diferentes grados de tinción desde ausencia de ésta hasta tinción débil, en el caso 18 se observó mayor tinción (+++,++++) también se observaron algunas células negativas (-), en estos tumores se observaron algunas células mitóticas (anafase) **Figura 18**. En este tipo de tumores no se observaron rosetas de Flexner Wintersteiner, por lo que las células se observan desorganizadas en el tejido tumoral. En ninguno de estos casos se identificó alguna mutación en los exones analizados del gen Rb1.

**Tabla 9. Observaciones de la tinción de pRb en los tejidos del tumor de retinoblastoma y su correlación con el análisis molecular.**

Paciente <sup>1</sup>	Tipo de Rb <sup>2</sup>	Mutación <sup>3</sup>					Grado de diferenciación del tumor <sup>4</sup>	Patrón de tinción <sup>5</sup>
		Exones	3	8	18	19		
Control	Sin Retinoblastoma							Retina Segmentos externos - Nuclear externa -,+++ Plexiforme externa - Nuclear interna +++,++++,- Plexiforme interna - Células ganglionares ++,-
Rb-2	Bilateral	-	+	-	-	+	-	Bien diferenciado -
Rb-3	Bilateral	-	-	-	-	-	-	Medianamente diferenciado +++, -
Rb-4	Unilateral	-	-	-	-	-	-	Indiferenciado +++, +
Rb-5	Unilateral	-	-	-	-	-	-	Indiferenciado ++, -
Rb-11	Bilateral	-	-	-	-	-	-	Indiferenciado -, ++
Rb-15	Bilateral	-	-	-	-	-	-	Medianamente diferenciado +,++,-
Rb-17	Unilateral	-	-	-	-	-	-	Bien diferenciado +++,++++
Rb-18	Unilateral	-	-	-	-	-	-	Indiferenciado +++,++++,-

1) Rb-2. Rb-18 es la clave que se le asignó al tumor en estudio del caso índice correspondiente.

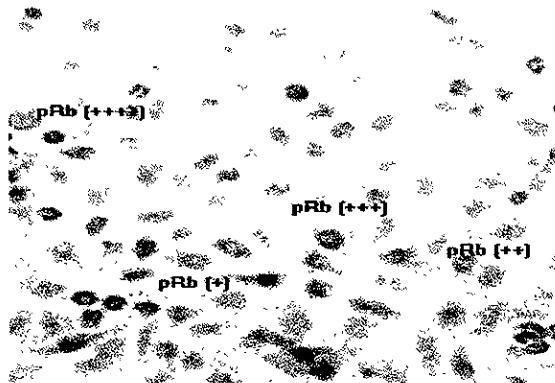
2) Tipo de retinoblastoma se refiere a la forma en que se manifiesta la neoplasia unilateral o bilateral.

3) Mutación identificada en los exones analizados, en este caso solo en el DNA de tumor del paciente Rb-2 se encontró una mutación puntual.

4) Grado de diferenciación en el tumor indica la estructura del tejido que se observó en el tumor

5) Patrón de tinción se refiere a la intensidad de ésta para la proteína pRb en las células, con respecto al control de la línea celular Saos-2 transfectada con el gen Rb1, en donde el signo - indica que no hubo tinción de la proteína, + tinción débil, ++ tinción mediana, +++ tinción intensa. Cuando los símbolos están separados por comas quiere decir que la capa tuvo diferentes grados de tinción, el orden de los símbolos presentan decrecientemente la predominancia de los mismos.

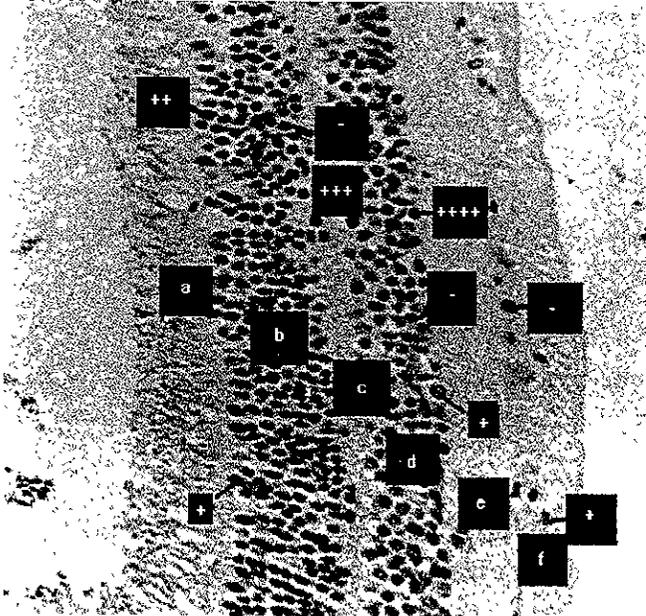
En el caso índice de la familias Rb-2 se identificaron dos mutaciones; una en el exón 8 y otra en el exón 20



**Figura 12.** Control positivo para la inmunotinción en la línea celular Saos-2 Rb1<sup>+/+</sup> transflectada con el gen Rb1. La metodología se realizó como se indica en Sujetos y Métodos. Se observan las células positivas para la presencia de la proteína, de manera que se le asignaron ++++ para esta intensidad de tinción. Aumento 40X.



**Figura 13.** Control negativo para la inmunotinción en la línea celular Saos-2 Rb1<sup>-/-</sup> sin transfectar. La metodología se realizó de acuerdo a lo descrito en Sujetos y Métodos. Todas las células se observan negativas para la inmunotinción. Aumento 40X.



**Figura 14.** Inmunohistoquímica de una retina normal. La técnica se realizó como se describe en Sujetos y Métodos. Se observan las capas de la retina; *a* corresponde a los segmentos externos o fotosensibles fotorreceptoras, formadas de conos y bastones *b* Capa nuclear externa. En *c* se observa la capa plexiforme externa que no presenta núcleos La Capa *d* corresponde a la nuclear interna. En *e* se observa la capa plexiforme interna anucleada. En *f* se muestra la capa de células ganglionares, en donde se observan núcleos con diferente grado de tinción mostraron tinción débil (+), mediana (+++), intensa (++++). Algunos mostraron tinción negativa (-). Aumento 16X.

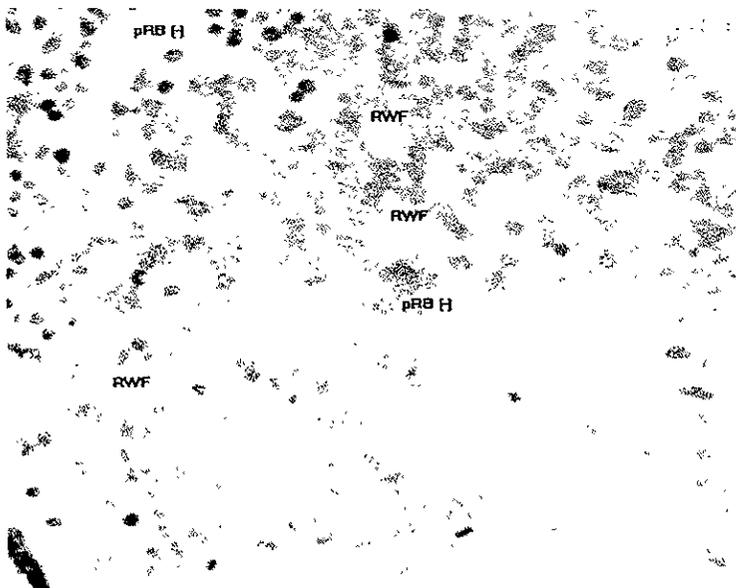
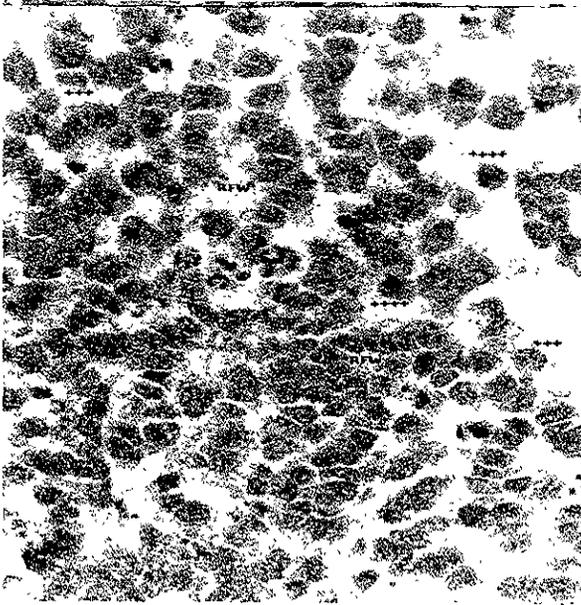
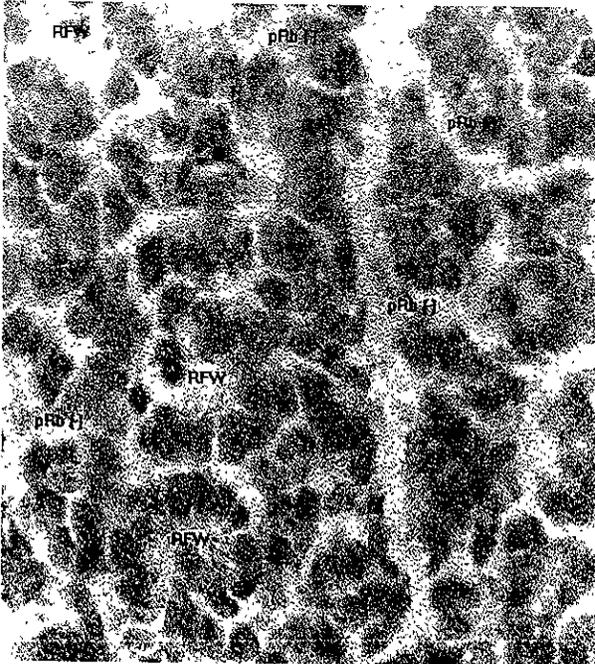


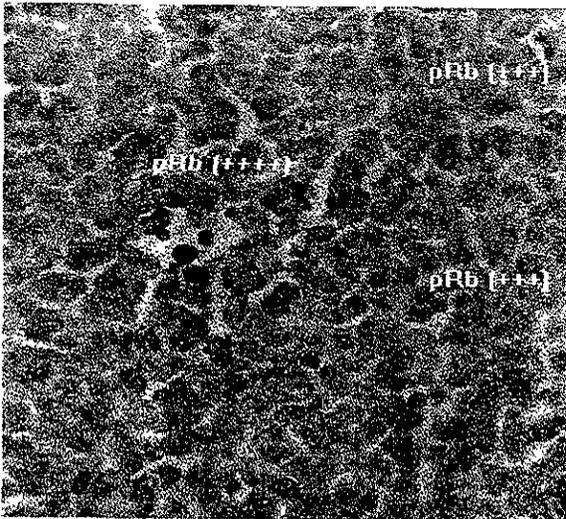
Figura 15. Inmunohistoquímica de un retinoblastoma. Es un tumor negativo para la tinción en donde no se observa la proteína pRb. La técnica se realizó de acuerdo a lo descrito en Sujetos y Métodos. Este tumor muestra diferenciación en rosetas de Flexner Wintersteiner (RWF) con un patrón de tinción negativo para la pRb (-). Aumento 16X



**Figura 16.** Inmunohistoquímica de un retinoblastoma diferenciado. Es un tumor que presenta tinción positiva para todas las células del tumor, observándose la disposición de las células en rosetas de Flexner Wintersteiner (RFW) características en este tipo de tumor. La intensidad de la tinción fué mediana tinción (+++) e intensa (++++). La técnica se realizó como se describe en material y métodos. Aumento 40X.



**Figura 17.** Control negativo para la inmunohistoquímica en un retinoblastoma. Es el mismo tumor que el de la figura 15, en este caso no se utilizó el anticuerpo dirigido contra la proteína pRb, como se detalla en Sujetos y Métodos. Es un tumor diferenciado en Rosetas de Flexner Wintersteiner (RFW), en las células no se observa la proteína pRb así que éstas fueron negativa para la tinción (-). Aumento 40X.



**Figura 18.** Inmunohistoquímica de un tumor indiferenciado. Es un tumor en donde predominan las células positivas para la inmunotinción, la técnica se realizó de acuerdo a lo descrito en Sujetos y Métodos. Se observan diferentes grados de tinción; células negativas (-), mediana tinción (+++) y tinción intensa (++++). Aumento 40 X.

## VII DISCUSION

### A. Análisis genético y citogenético

Los resultados obtenidos del análisis genético de los árboles genealógicos en las 19 familias con retinoblastoma, revelaron que 16 de éstas no tenían antecedentes familiares, la neoplasia se presentó de manera unilateral en 11 familias y en las 5 restantes el caso índice presentó retinoblastoma bilateral. En las 3 familias que presentaron antecedentes familiares la forma bilateral afectó a dos casos índice y un caso se presentó de forma unilateral, es importante mencionar que ninguno de los casos índice tienen antecedentes familiares de otro tipo de neoplasias. De manera general se observó que el retinoblastoma unilateral se presentó en un 63% y el bilateral en un 34% lo cual coincide con lo reportado en otros países incluyendo el nuestro, en donde la forma esporádica (no heredada) es unilateral de manera unifocal y representa el 60% de todos los casos de retinoblastoma. En la forma familiar generalmente ambos ojos están afectados y en algunos casos puede ser multifocal en cada ojo, además el tumor también puede ser tanto unilateral como bilateral, las formas hereditarias se presentan en el 40% de los casos (Stahl A. y col., 1994, Scriver Ch y col., 1995, Salamanca y col., 1984)

Mediante el análisis citogenético de los pacientes analizados no se detectó alguna deleción en el cromosoma 13 región q14 1, esto correlaciona con los reportes que indican que solo en el 5% de los pacientes se puede observar deleción de esta banda por métodos citogenéticos, por lo que el tamaño de la población analizada es pequeña para observarse la deleción (Janson M. y col., 1994).

#### a). Retinoblastoma unilateral.

##### 1) Familiar.

De las 19 familias analizadas se encontró que en 12 de éstas el caso índice presentó retinoblastoma unilateral, al realizar el estudio genético de los árboles genealógicos de estas familias, se encontró que solo en la familia Rb-16 existen antecedentes heredofamiliares de la neoplasia (Figura 5). En esta familia el caso índice presentó retinoblastoma unilateral y tiene tres hermanos que también padecieron la enfermedad además de familiares con antecedentes de la neoplasia por vía paterna. En esta familia el alelo mutado se está heredando de manera colateral debido a que no hay transmisión directa del padecimiento de padres a hijos, pero sí existen más de dos individuos en la misma generación que la padecen como en el caso de los individuos III-1, III-2, III-9, III-14; IV-2, IV-3, IV-4 y IV-6 de la familia Rb-16 (Figura 5). Se puede sugerir que en esta familia los progenitores (individuos II-4, II-6, II-8 y III-3) transmiten el gen anormal, el hecho de no manifestar el padecimiento corresponde a no penetrancia y se debe a

que no se generó la segunda mutación en el gen Rb1, de manera que estos individuos son portadores del alelo alterado que viene segregando con la enfermedad, dando como resultado un tipo de herencia que se le conoce como "dominancia irregular" (Sorsby A., 1972; Carlson E. y col., 1979). El sujeto I-2 debe presentar también la mutación ya que tiene descendientes afectados con sus dos esposas. Como se puede observar en la **Tabla 4** el cariotipo del caso índice y de sus hermanos con el mismo padecimiento (**Figura 5**) fue normal así como el de sus padres, por lo que se puede sugerir que de existir una alteración en el gen Rb1, ésta no es detectable por métodos citogenéticos (Cavenee W. y col., 1985). Solo en una pequeña proporción (5%) se ha reportado que tienen alteraciones cromosómicas (translocaciones entre otras) que involucran eliminación de la región 13q14.1 del cromosoma 13 que pueden observarse en el cariotipo (Janson M y col., 1994). De acuerdo a estos resultados se puede inferir que los individuos IV-2, IV-3, IV-4 y IV-6 de la familia Rb-16 tienen una mutación constitucional en el gen Rb1 que viene segregando por línea germinal. Es decir de acuerdo a la hipótesis de Knudson la primer mutación se dió en células germinales o durante la embriogénesis y la segunda mutación se generó en células somáticas de la retina. De esto se puede sugerir que el retinoblastoma bilateral se está expresando de manera incompleta debido a que los cuatro afectados lo presentaron de manera unilateral (Sorsby A., 1972), por lo tanto estos tienen una probabilidad del 50% de heredar el alelo mutado a sus descendientes en los cuales puede ocurrir la segunda mutación en células de la retina dando como resultado el desarrollo de retinoblastoma (Knudson A., 1971).

## 2) Esporádico

Las 11 familias (Rb-1, Rb-4, Rb-5, Rb-6, Rb-8, Rb-9, Rb-10, Rb-12, Rb-17, Rb-18 y Rb-19) que también presentaron retinoblastoma unilateral pero sin antecedentes heredofamiliares se muestran en la **Tabla 5**, al no existir antecedentes familiares y presentar retinoblastomas esporádicos unilaterales, se puede inferir que estos pacientes desarrollaron la neoplasia por cualquiera de las siguientes causas:

A) Debido a que los dos eventos mutacionales *de novo* se originaron en células somáticas. De ser así no hay riesgo de transmisión a sus descendientes (Sorsby A., 1972).

B) Debido a una mutación que se dió en el embrión en las primeras etapas del desarrollo del afectado, en este caso habría riesgo de transmisión a sus descendientes si la mutación afectó también las células gonadales (Carlson E. y col., 1979).

C) El desarrollo de retinoblastoma pudo originarse por una mutación *de novo* en alguno de los gametos de los progenitores generando una mutación de tipo constitucional como consecuencia existe la posibilidad de transmitirla a los descendientes del afectado. Este evento

en particular se dá en el 15% de los individuos que presentan retinoblastoma unilateral y también se conoce como retinoblastoma bilateral que se está expresando de manera incompleta (*Sorsby A , 1972, Carlson E. y col., 1979, Gallie B L y col., 1990*).

D) Existe además otra posibilidad y es el hecho de que la mutación constitucional viene segregando por línea germinal en una familia, por lo que ésta se encuentra en alguno de los progenitores de manera que la descendencia de los individuos con esta mutación tienen predisposición al desarrollo de retinoblastoma. Esto se conoce como no penetrancia por lo que la expresión fenotípica del gen estaría reducida y como se mencionó anteriormente es un retinoblastoma bilateral que se expresa de manera incompleta.

E) Se ha hecho menos énfasis en la posibilidad de mosaicismismo para la mutación inicial ya sea en el primer individuo afectado en una familia o en uno de los padres. El mosaicismismo puede ocurrir cuando una mutación inicial en el gen Rb1 no se produce en todas las células durante la embriogénesis o no se encuentra en todas las células germinales (*Sippel K y col., 1998*)

#### b). Retinoblastoma bilateral

##### 1) Familiar.

Las familias que presentaron retinoblastoma bilateral fueron 7, de las cuales las familias Rb-7 y Rb-13 presentan antecedentes familiares por vía materna de acuerdo al árbol genealógico. En ambos casos el tipo de herencia de la neoplasia es de tipo autosómico dominante sin embargo se sabe que a nivel molecular es recesivo (*Sorsby A., 1972, Carlson E y col., 1979, Zhu X y col., 1989*), ésta fué heredada por la madre del caso índice que padeció retinoblastoma en su infancia (la madre del caso Rb-7 padeció retinoblastoma bilateral y la del caso Rb-13 fué de tipo unilateral). Debido a esto se deduce que el gen Rb1 alterado es constitucional, éste se encuentra en los gametos de las madres y viene segregando por línea germinal hacia su descendencia de manera que las madres de los casos índice le heredan la mutación generando heterocigosidad para este gen (*Gallie B L y col., 1990, Munier L F y col., 1994*)

##### 2) Esporádico.

Las familias que presentaron retinoblastoma bilateral sin antecedentes fueron Rb-2, Rb-3, Rb-11, Rb-14 y Rb-15 (Tabla 5). Los casos índice Rb-2, Rb-11 y Rb-14 presentaron un cariotipo normal 46, XY, el caso índice Rb-3 presentó un cariotipo 47, XXY, var (1)(q12 GTG 44), var (1)(q12 GTG 14) (Tabla 5). Esta nomenclatura indica que el individuo tiene 47 cromosomas, el cromosoma extra es el X y su origen se debe a una no disyunción meiótica paterna o materna, se acepta que en el 40% de los pacientes el cromosoma extra es de origen paterno mientras que el 60% su origen es materno. En el cariotipo de este paciente se identificó además un polimorfismo en el cromosoma 1 en la región q12, GTG indica que se utilizó la

técnica de bandas G por tripsina usando Giemsa. Los números 44 indican tamaño e intensidad de la banda polimórfica, para este caso se considera grande e intensa respectivamente. Este complemento cromosómico está asociado al síndrome de Klinefelter descrito por primera vez en 1942, este síndrome se caracteriza por disgenesia testicular, gonadotropinas elevadas (FSH) y concentraciones disminuidas de 17-cetoesteroides en orina. La azoospermia es un hallazgo constante en estos pacientes, lo cual explica el que sean estériles, la mayor parte de pacientes con este síndrome tienen desarrollo intelectual normal. Sin embargo algunos presentan retardo mental moderado, el síndrome de Klinefelter se diagnostica generalmente en la pubertad, por lo que no es fácil identificar la enfermedad a edades pediátricas tempranas (Salamanca F 1990).

La mayoría de los pacientes que presentan retinoblastoma bilateral no tienen historia familiar de la neoplasia por lo que se cree que se debe a mutaciones en células reproductoras de alguno de los progenitores o durante el desarrollo temprano del embrión (Zhu X y col, 1989), generando heterocigocidad en el gen Rb1, por lo que el individuo desarrolla retinoblastoma bilateral si ocurre la segunda mutación en células de la retina de ambos ojos (Knudson A., 1971). Además si tanto las células somáticas como gonadales están afectadas, las posibilidades de heredar el gen alterado a su descendencia son altas, como ya se ha discutido anteriormente (Zhu X y col, 1989, Naumova y Sapienza, 1994).

En el momento de la concepción, con la excepción de la familia Rb-3 los padres se encontraban en una edad reproductiva adecuada lo que descarta que ésta pudiera estar influyendo en el desarrollo de retinoblastoma. El caso índice de la Rb-3 presentó retinoblastoma bilateral, esto sugiere que la primera mutación se generó en las etapas tempranas del desarrollo embrionario, o que se generó *de novo* en células germinales de uno de los progenitores. Existen reportes de algunos autores que sugieren que las mutaciones germinales en el gen Rb1 parecen surgir más frecuentemente en el alelo paterno que en el materno, generando individuos que llevan una mutación constitucional o heterocigocidad en este gen (en el 85% de los casos) (Carlson E. y col, 1979; Gallie B. L. y col, 1990; Munier L. F. y col, 1994; Naumova y Sapienza, 1994; Sthal A. y col, 1994; Munier L. F. y col, 1998). Esto puede indicar ya sea que la mutación del gen Rb1 es más común durante la espermatogénesis que durante la ovogénesis, como un resultado de las diferencias entre la meiosis femenina y masculina ya que durante la espermatogénesis el número de divisiones celulares es mayor que en la ovogénesis. Debido a que el genoma de espermatozoides, tiene un alto contenido de metilación comparado con el DNA hipometilado de los ovocitos, está más expuesto a desaminación espontánea de la 5-metilcitosina generando mutaciones puntuales (transición) C → T en los dinucleótidos CpG. Además se cree que los diferentes estados de metilación del DNA de espermatozoides y de los ovocitos puede persistir

temporalmente en el cigoto y por lo tanto se puede generar una mutación preferencial paterna (Zhu X. y col., 1989, Dryja y col., 1989, Gallie L. B. y col., 1990, Naumova y Sapienza 1994, Kato V. M. y col., 1994b, Dryja T. P. y col., 1997, Munier L. F. y col., 1998). Se debe considerar que las suposiciones con respecto al origen parental de las mutaciones que predisponen a retinoblastoma no están bien sustentadas ya que aún no se ha comprobado cual es el mecanismo que propicie una mayor frecuencia de mutaciones en los gametos masculinos.

En retinoblastoma hereditario, diferentes estudios indican una transmisión preferencial paterna a su progenie del alelo Rb1 mutado, esto sugiere que existe algún mecanismo meiótico que favorece este fenómeno Girardet A., y col., trataron de investigar si la alteración en la segregación de las células que portan el alelo mutante ocurre antes de la fertilización, sus resultados indican que la alteración en la segregación no ocurre durante la espermatogénesis por lo que proponen que después de la eyaculación, pudiera existir algún mecanismo que proporcione alguna ventaja a los espermatozoides portadores del alelo alterado, como una mejor movilidad que favorece la fertilización tal y como se ha visto en *Drosophila* (Girardet, A. y col., 2000).

c). Edad de inicio del retinoblastoma

En este estudio la mayor proporción de pacientes iniciaron el padecimiento desde recién nacidos hasta los 5 años de edad, lo cual corresponde a lo que se ha reportado en la literatura. De hecho la mayor incidencia reportada es entre recién nacidos y seis años de edad (Ortiz B. y col., 1996, Martinez R. G. y col.), sin embargo el caso índice de la familia Rb-5 manifestó la neoplasia a los 9 años (Tabla 5, Rb-5). En este caso el retinoblastoma se considera tardío aunque en ocasiones se ha reportado en adultos (Pam V. A. y col., 1998, Scriver Ch. R. y col., 1995). Hasta el momento no se han sugerido mecanismos responsables que expliquen el desarrollo tardío de retinoblastoma y los estudios acerca de la embriogénesis del retinoblastoma son pocos, por lo que no se ha planteado una hipótesis al respecto.

d). Proporción de sexos.

En cuanto a la proporción de sexos en los pacientes con retinoblastoma se observó que de las 19 familias estudiadas (Tabla 4 y 5), 8 de los casos índice son del sexo femenino y 11 corresponden al sexo masculino. A pesar de que se observó un ligero aumento en la proporción de individuos de sexo masculino que desarrollan retinoblastoma las diferencias no fueron estadísticamente significativas. En México existen algunos estudios que se han realizado con respecto a la proporción de sexos, Ortiz B. y col., (1996) y Marinez G. R. y col. (1995) reportan que el retinoblastoma fue más frecuente en el sexo masculino independientemente de la edad, habiéndose obtenido una relación M/F de 1.6:1.0 (Ortiz B. y col., 1996, Martinez G. R. y col. 1995)

Para tratar de explicar la distorsión de la segregación en cuanto a la proporción de sexos en individuos que padecen retinoblastoma Naumova y Sapienza (1994) propusieron la siguiente hipótesis. Debido a que la distorsión de sexo involucra dos cromosomas diferentes (Y y 13 con la mutación en el gen Rb1), y ocurre entre la progenie de hombres, es probable que exista un proceso capaz de actuar en trans y dar sensibilidad al origen parental de los alelos, este proceso sería la impronta genómica. La hipótesis que se propone sugiere que los varones con retinoblastoma bilateral esporádico, son portadores de un gen defectuoso de impronta en su cromosoma X, debido a esto son incapaces de borrar la impronta materna y/o reestablecer la impronta paterna en la porción del genoma heredado de sus madres, además tienen alterado el gen Rb1 en uno de sus cromosomas. La descendencia de estos varones tendrá cuatro posibilidades; los dos embriones femeninos no sobrevivirán debido a que el padre afectado transmite su cromosoma X (el cual tiene el gen defectuoso de impronta). Sólo serán viables aquellos que tengan un cromosoma Y y que además tienen un alelo Rb-1 alterado, lo cual se ve reflejado en la desproporción de sexos y el desarrollo de retinoblastoma en los varones. A pesar de los resultados anteriores y de la hipótesis propuesta no existe algún reporte que confirme alguna preferencia en donde se vean afectados individuos del sexo masculino.

### **B. Análisis molecular**

El retinoblastoma es un tumor embrionario del ojo que afecta a la niñez, es el prototipo de neoplasias en donde la predisposición hereditaria juega un papel principal en la oncogénesis. Es causado por dos eventos mutacionales en el locus del gen Rb1. La presencia de mutaciones en el gen Rb1 en los afectados por esta enfermedad confirma que la alteración en este gen está asociada al desarrollo de retinoblastoma (*Knudson 1971*). Estas mutaciones constituyen casi el espectro completo de alteraciones genéticas, desde eliminaciones grandes hasta cambios en una sola base. Las mutaciones muestran una extensa heterogeneidad y se han identificado en la mayoría de los 27 exones del gen Rb1, que se distribuyen a lo largo de 183 Kb del DNA genómico (*Hogg A. y col., 1993; Blanquet V. y col., 1993, Blanquet V. y col., 1994; Lohmann D y col., 1994, Blanquet y col., 1995; Lohmann D. y col., 1996*).

En este trabajo se realizó el análisis molecular en el DNA de 19 pacientes con diagnóstico de retinoblastoma unilateral o bilateral. La importancia de conocer el tipo de mutaciones más frecuentes en este gen, se debe al hecho de que nos permite identificar la ubicación y frecuencia de mutaciones que predisponen a esta neoplasia en nuestra población sobre todo en los casos familiares, ya que esto nos permitirá aportar algún beneficio en el asesoramiento genético

Con la finalidad de determinar el tipo de mutaciones en el gen Rb1 de los pacientes con retinoblastoma, se realizó la co-amplificación de los exones 3, 8, 18, 19, 20 y 23, de los cuales el 3, 8 y 18 se han reportado más frecuentemente mutados y algunos autores han sugerido que podrían ser puntos caliente dentro del gen Rb1. Los exones 19 y 20 corresponden a las regiones codificadoras del dominio B de la proteína pRb y el 23 es uno de los exones que codifica para el dominio carboxilo terminal que tiene dos sitios de fosforilación (*Blanquet y col., 1995, Mancini D. y col., 1997*) El análisis de los diferentes exones se realizó con oligonucleótidos diseñados específicamente para unirse a los extremos de cada exón, permitiendo así determinar la longitud de las eliminaciones genéticas y definir si el marco de lectura del gen Rb1 está en fase o no.

**a). Detección de mutaciones grandes.**

En las muestras de DNA la amplificación por PCR no reveló mutaciones, posiblemente porque con la electroforesis en agarosa en donde se analizaron los productos de amplificación no se pueden detectar cambios menores de 20 pb. La proporción baja de detección de mutaciones mediante este método no es único para el gen Rb1. Esto refleja las dificultades del análisis mutacional en este tipo de genes grandes que tienen una extensa heterogeneidad mutacional, y que plantea la necesidad de implementar diversas técnicas para determinar las mutaciones. Desde la clonación del gen Rb1 en 1986, la mayoría de las primeras mutaciones reportadas incluían alteraciones estructurales gruesas que eran detectadas a través de hibridación Southern en el 9-16% de los eventos responsables de la enfermedad (*Friends y col., 1986; Lee y col., 1987*).

Antes de que se realizaran varios estudios para tratar de identificar el tipo de mutaciones en el gen Rb1, había pocos reportes de mutaciones puntuales, eliminaciones pequeñas o inserciones. En los casos familiares de la neoplasia, la transmisión de la enfermedad solo se podía seguir a través de análisis de ligamiento (RFLPs), sin embargo esta metodología es limitada ya que en el 75% de los casos de retinoblastoma las mutaciones son nuevas y los pacientes no tienen antecedentes familiares. Debido a esto los casos unilaterales también constituyen un problema para el asesoramiento genético ya que el 15% de estos son de hecho debido a mutaciones germinales (*Janson M y col., 1994, Blanquet y col., 1993*) En cuanto a los casos esporádicos, la prevención y el asesoramiento no podía plantearse de manera adecuada por la falta de conocimiento de las bases moleculares del retinoblastoma. Todos los métodos previamente usados para la detección de mutaciones puntuales, son demasiado laboriosos para analizar un gen grande con una variedad tan alta de mutaciones como sucede en el gen

Rb1, además se ha observado que casi todos los pacientes no relacionados tienen diferentes tipos de mutaciones (Blanquet V y col., 1993)

#### b). Identificación de mutaciones

La identificación de la gran variedad de mutaciones a lo largo del gen Rb1 se ha realizado con diversas técnicas (SSCP, DGGE y secuenciación directa) Los principales tipos de mutaciones que se han identificado en el gen Rb1 son; eliminaciones grandes en un 15%, alteraciones de pequeña longitud en un 26% y sustitución de bases en el 42% (Lohmann D y col., 1996, Blanquet V. y col., 1995; Blanquet V. y col., 1993; Lohmann D y col., 1994; Hogg A. y col., 1993)

Se han realizado diversos estudios moleculares que permitieron conocer la frecuencia de mutaciones en el gen Rb1, como el realizado en el DNA extraído del tumor de pacientes con retinoblastoma en donde identificaron mutaciones del gen Rb1 en el 80% de los tumores. Por otro lado el análisis molecular en DNA constitucional en pacientes con esta neoplasia, proporcionó información acerca del espectro de mutaciones en este gen, encontrándose mutaciones en el 10-30% de los casos de retinoblastoma (Cowell K J y col., 1994, Janson M. y col., 1994; Blanquet V y col., 1995). Debido a la gran heterogeneidad de mutaciones en el gen Rb1, es necesario realizar el análisis mutacional en pacientes con retinoblastoma, ya que nos permitira una adecuada predicción del riesgo en pacientes con retinoblastoma aislado.

De los 19 pacientes analizados solo fué posible identificar polimorfismos en el DNA de los pacientes 2T-Rb, 12T-Rb y 8S-Rb, las regiones que mostraron un polimorfismo corresponden a los exones 8, 18 y 20 respectivamente en el DNA de linfocitos o de tumor.

El DNA de tumor del paciente 2T-Rb mostró un polimorfismo en el exón 8, esto indica que existe una mutación en esta región por lo que procedimos a secuenciarla El análisis de la secuencia indicó la adición de una adenina, generando un cambio en el codón normal de AAC al codón AAA en la posición 304 del cDNA y como consecuencia la mutación originó una Lys en lugar de una Asn. La mutación provocó que el marco de lectura se recorriera formando un codón de paro en la posición 316 del cDNA. Existen varios reportes de mutaciones en este exón, entre estos se han identificado cambios de *Gly* por *Val* en la posición 256 del cDNA, en este caso también se corrió el marco de lectura y se generó un codón de paro en la posición 263. Otra mutación reportada en este exón es el cambio de *Ser* por *Val* en la posición 259 del cDNA, la alteración recorrió el marco de lectura dando un codón de paro en la posición 263 del cDNA (Lohmann D, y col., 1994) Un análisis extenso realizado por Lohmann y col., en 119 pacientes con retinoblastoma bilateral indicó que la mayoría de las mutaciones identificadas conducen a la formación de codones de paro que impiden que se complete la traducción de la proteína pRb (Lohmann D y col., 1996)

Es importante mencionar que el análisis de SSCP en el DNA del paciente 2T-Rb sugería la presencia de otro polimorfismo diferente al detectado previamente, sin embargo éste no era constante en todos los análisis por lo que se pensó que existen diferentes líneas celulares, algunas de ellas con la mutación. Debido a esto se decidió confirmar si realmente el polimorfismo en el exón 20 se debía alguna mutación, por lo que se procedió a secuenciarla. El tipo de mutación que se identificó fue una transversión  $A \rightarrow T$  en el codón 704 del cDNA, que no generó un codón de paro, este tipo de mutación no se ha reportado en la bibliografía. Debido a la presencia de dos mutaciones diferentes en este gen se dice que es heterocigoto compuesto para el gen Rb1.

El caso índice de la familia 2T-Rb presentó retinoblastoma bilateral sin antecedentes familiares, el hecho de ser bilateral indica que existe una mutación germinal que confiere predisposición hereditaria al retinoblastoma o que hubo una mutación *de novo* en el gen Rb1 durante el desarrollo embrionario. La mutación del gen Rb1 puede ocurrir en una etapa tardía de la embriogénesis, dando como resultando una expresión variable de la neoplasia dependiendo del tejido afectado. Esto generó mosaicismo lo que evita la detección de la anomalía constitucional en linfocitos de sangre periférica (Munier F. L. y col., 1998, Zucker J. M. y col. 1998). En nuestro paciente solo fue posible detectar las mutaciones en el DNA del tumor. De acuerdo a estos resultados se puede sugerir lo siguiente, cualquiera de las dos mutaciones puede ser de tipo constitucional y el hecho de no identificarla en linfocitos de sangre periférica se debe a que pudiera existir un mosaico para alguna de las dos mutaciones en este tipo de células, se especula esto porque según el tipo de retinoblastoma que se presenta debe existir una mutación constitucional. Se han realizado investigaciones en familias con retinoblastoma para detectar mosaicismo. Los resultados indican que en ~10% de ellas se encontró mosaicismo en al menos un miembro de la familia, sin embargo la proporción actual de familias con retinoblastoma con un miembro con mosaico es probable que sea más alto (Sippel K. C. y col., 1998).

En 1979 Carlson y Desnik (1979) propusieron que el mosaicismo mutacional es la explicación de la expresión variable en pacientes con Retinoblastoma. De acuerdo a este modelo la expresividad reducida en pacientes que son mosaicos para una mutación que predispone a retinoblastoma refleja el hecho de que hay pocas células blanco para la segunda mutación. La incidencia de mosaicismo debería ser alta en enfermedades como retinoblastoma, debido a que una gran proporción de todos los casos representan mutaciones nuevas y el mosaicismo somático puede ocurrir en un padre con un fenotipo normal. El mosaicismo es una

causa establecida de variación fenotípica en la expresión de otras enfermedades genéticas (Sippel K. C y col., 1998).

La experiencia indica que la frecuencia alta de mosaicismo en pacientes con retinoblastoma no se toma en cuenta por muchos consejeros genéticos. Cuando se proporciona asesoramiento genético a pacientes y miembros de la familia, frecuentemente no se hace énfasis al mosaicismo debido en parte a lo incierto en el riesgo de recurrencia que produce éste y en parte a la dificultad de explicar claramente con los principios de los genetistas la implicación del padecimiento a los pacientes con retinoblastoma no familiar (Sippel K C y col., 1998) Siempre que se tenga un caso de retinoblastoma aislado, se debe tener en cuenta la posibilidad de mosaicismo para una mutación y así proporcionar un asesoramiento genético adecuado.

Estudios previos que combinan datos de varios casos han encontrado que ~45-50% de la progeñe de pacientes con retinoblastoma bilateral sin antecedentes familiares desarrollaron retinoblastoma, estos datos llevan a concluir que todos los pacientes afectados bilateralmente son portadores de la mutación en la línea germinal y que la no penetrancia ocasional de portadores explica la proporción insignificante de transmisión de menos del 50%. En estos estudios se describieron mosaicos en pacientes afectados bilateralmente que tuvieron una mutación inicial, que no se detectó en todos los leucocitos, probablemente en estos individuos existe una línea germinal con mosaico en donde hay células libres de la mutación y células portadoras de ésta (Sippel K C y col., 1998) También se han reportado pacientes con mosaicismo cromosómico, los cuales presentan eliminaciones 13q14.1 que causan el desarrollo de retinoblastoma, el porcentaje de linfocitos que tienen anomalías citogenéticas cambian con el tiempo (Motegi y Minoda 1983).

Otra mutación que se identificó por SSCP y se comprobó mediante secuenciación directa se encontró en el exón 18 en el DNA de tumor del paciente 12T-Rb. Este paciente presentó retinoblastoma unilateral y no tiene antecedentes familiares de la neoplasia, el tipo de mutación que se identificó fue eliminación de una timina en la posición 613 del cDNA, el codón normal TCA cambió al codón CAC por lo que hubo un cambio de una Ser por una His. Esta mutación corrió el marco de lectura generando un codón de paro en la posición 656 del cDNA, en la bibliografía aún no se ha reportado este tipo de mutación. Es importante enfatizar que tampoco se encontró mutación en los linfocitos del paciente Resultados similares fueron reportados por Lohmann y col (1997), en pacientes con retinoblastoma unilateral sin antecedentes familiares de la neoplasia, en donde identificó mutaciones (transiciones y eliminaciones) en el tumor pero

no en los linfocitos (*Lohmann D y col., 1997*) De manera que el hecho de no detectar alguna mutación en los linfocitos podría deberse a.

1) La mutación constitucional se encuentra en exones diferentes a los analizados en el gen Rb1.

2) Existe un mosaico para la mutación en los linfocitos del paciente.

3) Las dos mutaciones se llevaron a cabo en las células de la retina, es decir ambas mutaciones son somáticas generando retinoblastoma unilateral esporádico, en este caso no existe una mutación constitucional.

En este individuo (12-Rb) también se identificó otra mutación con sentido, ya que el cambio de *CTT* por *CTG* no alteró la codificación del aminoácido debido a que ambos codones codifican para leucina.

El análisis de la mutación en pacientes con tumores unilaterales es importante debido a que ayuda a reducir de manera significativa el número de familiares en edad pediátrica que requieren vigilancia clínica debido al riesgo que presentan para desarrollar retinoblastoma. De manera que la investigación molecular en estos pacientes puede identificar portadores de mutaciones asociados con penetrancia incompleta y expresividad reducida para mejorar el conocimiento de la correlación genotipo-fenotipo (*Kutz M., y col., 1999; Gallie B L., 1997*)

Como ya se mencionó anteriormente, la enfermedad multifocal en pacientes sin una mutación en DNA de sangre periférica también puede ser causada por mosaico somático, en este caso se podría incluir al paciente 12T. *Lohmann y col., (1997)* mencionan el caso de una paciente que fue enucleado a los 2.3 meses, se identificó un nuevo foco del tumor en el otro ojo a los 10 meses de edad. Esta paciente recibió, sesiones sucesivas de criocoagulación, para sorpresa de los autores, ambas mutaciones identificadas en la muestra del tumor enucleado no se detectaron en el DNA constitucional de sangre periférica o en células de origen cefálico. Un paciente similar con retinoblastoma bilateral, cuyo DNA de fibroblastos no mostró la mutación identificada en el tumor, también fue reportado por Shimizu y col., (1994). Debido a que se ha investigado la presencia de mutaciones en pocos tumores, es interesante encontrar proporciones altas que no se esperan de casos que sugieren mosaico somático. El mosaico puede contribuir a que se detecte en menor proporción mutaciones en DNA constitucional en pacientes con retinoblastoma unilateral esporádico, comparado con las mutaciones observadas en casos familiares (*Lohmann D y col., 1997*)

Es muy importante tomar en cuenta que existe la posibilidad de mosaicismo en un caso de retinoblastoma unilateral sin antecedentes familiares, la ausencia de mutación en leucocitos no predice de manera confiable que no surgirán en el futuro tumores en el otro ojo, de manera

que los niños con este tipo de retinoblastoma se deben examinar frecuentemente para detectar tumores que podrían surgir en el otro ojo. Los casos reportados por Lohmann y col., (1997) indican que cuando se identifica una mutación inicial en el tumor del primer ojo y el análisis de DNA de leucocitos no detecta la mutación, los niños tendrán el riesgo de desarrollar un tumor en el otro ojo, por lo que en base a estos casos, el riesgo estimado para desarrollar un tumor en el siguiente ojo es de ~5% (Sippel K. C y col., 1998, Lohmann D. y col., 1997).

El riesgo de que un paciente con retinoblastoma unilateral sin antecedentes familiares tenga células germinales mutadas y por lo tanto sea portador de la mutación puede ser mayor del 12%, sin embargo algunos de estos pacientes serán mosaicos. Las proporciones calculadas de cada tipo (88% no portadores, 12% portadores) se basó en estudios retrospectivos de los progenitores de pacientes con este tipo de retinoblastoma, con estos estudios se demostró que estos pacientes tienen un riesgo de recurrencia de retinoblastoma de 5-6% (Sippel K. C y col., 1998)

Carlson y Col., (1979) usaron el mosaicismo mutacional como un modelo para analizar el origen y transmisión del retinoblastoma. Los autores suponen que la variabilidad de penetrancia y expresividad en casos familiares, se debe a alelismo múltiple, que es generado por distintas mutaciones en familias con retinoblastoma con baja penetrancia. Además también sugieren que el mosaicismo mutacional puede explicar la expresividad variable observada en pacientes con la enfermedad unilateral esporádica. De acuerdo con este modelo, la expresividad reducida en pacientes que son mosaico para las mutaciones que predisponen al desarrollo del tumor, refleja que pocas células pueden ser el blanco para una segunda mutación (Lohmann D y col., 1997).

Generalmente la mutación en la línea germinal se puede heredar de manera dominante por un progenitor afectado ó puede ser transmitida como una mutación precigótica. Se pueden sugerir dos pronósticos en los pacientes con retinoblastoma que presentan mosaicismo mutacional: (1) el mosaicismo somático puede reducir significativamente la susceptibilidad al desarrollo del tumor y (2) el análisis de ligamiento indicara baja penetrancia. Para mejorar el asesoramiento genético y comprender los mecanismos fundamentales de expresión y penetrancia de retinoblastoma, se debe determinar la incidencia del mosaicismo además de su influencia fenotípica en retinoblastoma hereditario (Munier L F y col., 1998) .

Debido a la gran variabilidad en cuanto a la sensibilidad (26-83%), de varios métodos utilizados para la búsqueda de mutaciones en el gen Rb1, no es sorprendente encontrar mutaciones en solo el 33% de los casos como lo reportan Blanquet V y col., (1995) y Lohmann D y col., (1996) En el presente trabajo se identificaron 5 mutaciones puntuales que fueron el

único tipo de alteración que encontramos ya que no se identificó otro tipo de mutaciones que involucre más de una base nucleotídica, en todos los casos la mutación generó un codón de paro. Una posible explicación al hecho de identificar mutaciones en solo 3 pacientes, podría ser que no se detectaron otras mutaciones como polimorfismos (mediante SSCP) o las mutaciones se pueden encontrar fuera de los exones analizados del gen Rb1.

Por otro lado debe tomarse en cuenta que existen otros mecanismos que pudieran estar involucrados en el desarrollo del retinoblastoma, como es el caso de una proteína diferente a pRb que pertenece a la familia de proteínas de retinoblastoma. Todos los miembros de esta familia comparten el dominio funcional que es muy importante para el control de la división celular.

Nuestros resultados sugieren que el mosaicismo puede ser un fenómeno frecuente, debido a que interfiere con la expresión y transmisión de retinoblastoma el mosaicismo mutacional somático puede causar expresión atenuada y esto unilateralidad o no penetrancia. Del mismo modo, el mosaicismo germinal puede explicar la no penetrancia ya que la mitad de la progenie de individuos con este mosaicismo heredan la susceptibilidad de desarrollar retinoblastoma. Este hecho se debería tomar en cuenta para calcular el riesgo de recurrencia de retinoblastoma, especialmente para fundadores masculinos en familias afectadas unilateralmente. De hecho se sabe que existe poca correlación establecida entre el tipo de alteración en el gen Rb1 y el desarrollo fenotípico de la enfermedad (*Munier L y col., 1998*).

Es importante dar un buen asesoramiento genético, por lo que se debe implementar el análisis molecular del gen RB1 de manera rutinaria en todos los pacientes con predisposición a retinoblastoma. Sin embargo se debe dar prioridad en primera al diagnóstico clínico temprano caracterizado por leucocoria y estrabismo reportado por los padres. Es importante el diagnóstico temprano de retinoblastoma para conocer el pronóstico de la visión y la sobrevivencia, como consecuencia, son necesarios los exámenes oftalmológicos repetidos en familiares pediátricos de niños con retinoblastoma. En el retinoblastoma hereditario el conocimiento de una mutación en la línea germinal del individuo permite de manera adecuada predecir el riesgo para los familiares, por otro lado es importante iniciar en los pacientes los primeros análisis moleculares del gen Rb1 para identificar alteraciones en el mismo. Debido a la presencia de mosaicismo en algunos pacientes, es necesario el análisis de DNA de células de tumor y de células constitucionales para confirmar o excluir retinoblastoma hereditario en pacientes con retinoblastoma unilateral.

En lo que respecta a las propiedades de la proteína en relación al fenotipo del retinoblastoma, Otterson y col., (1999) estudiaron las propiedades funcionales de una proteína

pRb mutada (712R) en el dominio pocket relacionada con el fenómeno de baja penetrancia. Observaron que ésta tiene propiedades bioquímicas similares a otras proteínas mutadas (480 y 661W), incluyendo la capacidad de fosforilación mediada por ciclinas. La identificación de alelos Rb1 con este tipo de mutación en la línea germinal de familias con penetrancia incompleta de retinoblastoma familiar, es el primer ejemplo de una relación genotipo-fenotipo dentro del gen Rb1 que relaciona resultados clínicos con análisis bioquímicos. Desde una perspectiva bioquímica, estos resultados enfatizan la importancia en el cuidado del asesoramiento genético de pacientes que presenten retinoblastoma unilateral esporádico, ya que ellos pueden tener una mutación germinal en el gen Rb1 (Otterson A. G y col., 1999)

Para dirigir las bases moleculares hacia la explicación de la baja penetrancia, se han estudiado las propiedades bioquímicas de tres alelos de baja penetrancia que corresponden al sitio donde hay un cambio en un aminoácido localizado en el dominio pocket de pRb específicamente entre los dominios A y B. Los resultados sugieren, que la inactivación parcial de mutantes de baja penetrancia pueden reflejar la supresión de tumor de Rb mediada por el dominio "pockets" específico de unión a proteínas celulares diferentes al factor de transcripción E2F1 que están relacionados con la diferenciación celular (Otterson y col., 1999)

En el DNA de linfocitos del paciente 8S-Rb también se identificó un polimorfismo mediante SSCP en el exón 20 que corresponde a una eliminación de una timina que originó el cambio del codón TCT por TAC en la posición 702 del cDNA, en este caso el codón mutado codificó para el mismo aminoácido, pero se recorrió el marco de lectura y se generó un codón de paro en el codón 707. Este paciente padeció retinoblastoma unilateral sin antecedentes familiares de esta neoplasia, no fue posible realizar el estudio molecular en el DNA del tumor debido a que el paciente respondió favorablemente a la quimioterapia y no se le enucleó el ojo. En base a estudios anteriores en este tipo de pacientes que muestran retinoblastoma unilateral sin antecedentes familiares se ha estimado que existe la probabilidad de que el 1.7% sean portadores de una mutación germinal (Lohmann D. y col., 1997). No se ha reportado esta mutación en el exón 20, pero se han reportado diversos tipos de mutaciones (germinales) con sentido como: el cambio de una Val por una Glu en el codon 654 del cDNA, cambio de una Gln por una Pro en la posición 685, mutaciones fuera de fase con una duplicación de 5 bases en la posición 679 del cDNA (Blanquet y col., 1995) Para definir la frecuencia y naturaleza de mutaciones constitucionales en retinoblastoma unilateral esporádico, Lohmann y col., (1997) analizaron el DNA de tumores y linfocitos de sangre periférica, encontraron mutaciones en el exon 20 que comprenden mutaciones puntuales como el cambio de C por T en la posición 1982 del cDNA generando el cambio de Arg por Trp en la posición 661 del cDNA, una inserción de 100 bases

en la posición 2065 del cDNA que generó un codón de paro en la posición 700 del cDNA, y una eliminación de una *T* en la posición 2084 del cDNA lo que provocó la formación de un codón en la posición 704 de cDNA (Lohmann y col., 1997)

En el presente trabajo se utilizó SSCP para identificar polimorfismos en 19 individuos que padecen de retinoblastoma, las mutaciones se confirmaron mediante secuenciación y las mutaciones puntuales fueron el único tipo de alteración que encontramos, esto coincide con los reportes acerca del espectro de mutaciones reportadas en el gen *Rb1*, la mayoría de las alteraciones identificadas son mutaciones puntuales y generan terminación prematura de la traducción (Lohmann y col., 1994)

### **C. Análisis Inmunohistoquímico.**

En este trabajo se analizaron 8 cortes histológicos de retinoblastomas (tabla 12) en los cuales se determinó la presencia o ausencia de la proteína pRb mediante inmunohistoquímica .

#### **a). Inmunohistoquímica de tejido normal**

En el corte histológico del ojo normal donde se realizó la Inmunohistoquímica (Figura 13) se observó heterogeneidad de la tinción para la pRb en las capas nucleadas de la retina. La capa nuclear externa que se compone principalmente de núcleos de células fotorreceptoras, presentó tinción heterogénea de los núcleos de conos y bastones. La capa nuclear interna que incluye núcleos de células ganglionares y amácrinas, mostró aproximadamente el 50% de núcleos positivos. Por último, la capa de células ganglionares, presentó escasos núcleos, pocos de ellos fueron negativos y la mayoría dieron una tinción positiva para la pRb. El patrón de tinción observado en la retina normal coincide con el que reporta Cordon-Cardo y Richon en donde investigaron la expresión de la proteína pRb en diferentes tejidos normales de humanos usando técnicas inmunoquímicas, en los tejidos analizados incluyen la retina, para lo cual utilizaron el anticuerpo anti-pRb monoclonal, que reconoce formas híper o hipofosforiladas de la proteína (Cordon-Cardo y col., 1994)

#### **b). Inmunohistoquímica de retinoblastomas.**

De los ocho tejidos tumorales analizados se encontraron los siguientes grados de diferenciación: tumor diferenciado en rosetas de Flexner-Wintersteiner, tumor medianamente diferenciado y tumor indiferenciado.

La inmunohistoquímica es la manera más conveniente para estudiar la expresión del gen *Rb1* en tumores primarios *in vivo* Se han publicado pocos estudios inmunohistoquímicos sobre la expresión de pRb que sean capaces de distinguir en los tumores la presencia de la proteína pRb y los que tienen expresión anormal de la misma Entre estos la mayoría de los estudios

han sido sobre tumores embebidos en parafina en donde han utilizado anticuerpos policlonales de conejo anti pRb (*Geradts y col., 1994*)

Los estudios previos de inmunohistoquímica en retinoblastomas se han encaminado 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 (GFAP), usada como marcador de astrocitos; glicoproteína asociada a la 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 y col., 1970, Molnar y col., 1984; Yuge y col., 1995*)

En este trabajo, los casos 2 y 17 mostraron tumor diferenciado en rosetas, la presencia de rosetas en un retinoblastoma se conoce también como neuroepitelioma o retinoblastoma neuroepiteliomatoso, esto se ha interpretado como un intento de reproducir el epitelio primitivo del tubo neural o las células receptoras visuales más altamente especializadas de la retina (*Popoff N., 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 y col., 1970, Yuge y col., 1995*) El caso Rb-2 fue el único con tinción homogénea negativa para la detección inmunohistoquímica de pRb, de hecho se esperaba este resultado debido a que en el gen Rb1 se identificaron dos mutaciones puntuales, una de éstas generó un codón de paro. En el resto de los tumores se observó la proteína pRb, en estos tumores predominaron los núcleos positivos desde tinción débil a intensa y hubo pocos núcleos negativos. En el estudio molecular de estos casos no se identificó ninguna mutación, esto no descarta la posibilidad de que exista alguna ya que no se analizaron todos los exones del gen Rb1. De hecho existen evidencias reportadas por Geradts y col., (1994), en donde identificó a la proteína pRb con una sustitución de un aminoácido, asociado con fosforilación alterada y como consecuencia se acumula en el núcleo. Se piensa que la proteína mutada no es funcional, y así la inmunohistoquímica se puede considerar como falsa positiva (*Geradts y col., 1994*). En el caso Rb-8 se identificó una mutación constitucional que generó un codón de paro, en este caso no fue posible realizar el análisis inmunohistoquímico sin embargo, es probable que la proteína no este presente en el tumor En el caso Rb-12 también se identificó una mutación que generó un codón de paro, no se identificó mutación de los exones analizados en el DNA de linfocitos, esto no descarta que

exista en otras regiones no analizadas. Sin embargo, aunque no se realizó el análisis inmunohistoquímico en este tumor se sugiere que la proteína no se encuentre presente en el tejido. En ambos casos se sugiere que la proteína no este en el tumor sin embargo no se debe descartar que existe la posibilidad de que pRb se encuentre en el tumor considerándose como una inmunohistoquímica falsa positiva como lo reporta Geradts y col., (1994).

El resto de los casos mostraron zonas de tumor indiferenciado con tinciones nucleares que van predominantemente de débil a intensa y con escasos núcleos negativos. Se observaron además algunas figuras mitóticas (anafases y metafases) y la proteína se localizó en el citoplasma. Geradts y col., (1994) habían observado localización citoplásmica 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 distribuyan en el citoplasma (Geradts y col., 1994).

En general en los retinoblastomas se observaron núcleos que sugerían la morfología de células en apoptosis, la apariencia de estas células concuerda con los núcleos picnóticos, material nuclear fragmentado y densamente compacto. En un trabajo realizado por Kogan H. y col (1995) con células de la línea Saos, sugirieron que la proteína 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 (Kogan H. y col., 1995). Por otro lado Jiang y col., (1997) demuestran que la familia de proteínas de retinoblastoma se expresan diferencialmente durante la embriogénesis del ratón. Estos resultados sugieren que los miembros de la familia del gen rb1 (ratón) tienen distintas funciones que en algunos casos se superponen en la embriogénesis, p107 y pRb posiblemente tienen funciones redundantes en el sistema nervioso central e hígado. Además observan que los embriones  $rb1^{-/-}$  (ratón) tienen incrementada la muerte celular durante el desarrollo de la retina (Jiang y col., 1997). Esto podría explicar la presencia de las células compatibles con morfología de apoptosis que se observaron en algunos de los retinoblastomas de este trabajo.

De manera general el hecho de encontrar diferentes grados de tinción para la pRb tanto en tumores diferenciados como indiferenciados pudiera tener varias explicaciones:

1. En los núcleos negativos para la inmunohistoquímica de pRb, en pacientes con retinoblastoma se puede sugerir que la ausencia de esta proteína es la responsable del desarrollo del tumor, debido a que se pierde la función reguladora del ciclo celular que normalmente ejerce pRb en los retinoblastos en vías de proliferación y diferenciación (Gallie y col., 1990, Goodrich D. W., 1993, Scriver Ch. y col., 1995, Wang J., 1997)

2. En los casos en donde se identificó la proteína pRb, se puede sugerir que la presencia de ésta no indica necesariamente que funcione de manera normal, ya que el anticuerpo que se utilizó para detectarla está dirigido contra el dominio carboxilo terminal por lo que no se puede diferenciar el estado de fosforilación de la proteína identificándose así a pRb ya sea en su forma hiper o hipofosforilada. De manera que pRb podría estar presente en su forma inactiva (hiperfosforilada) formando complejos con CDK's (*Weinberg A R. 1995, Gallie y col., 1990, Goodrich W D, y col., 1993*)

3. Otra posibilidad es que pRb pudiera estar formando complejos con otras proteínas como; proteínas celulares represoras (RBAR1) (*Kaneko y col., 1999*), o desacetilasas de histonas como HDAC1 (*Jaulin L. M y col., 1998; Brehm A. y col., 1998*) por lo que la formación de este complejo (pRb/oncoproteína ó pRb/proteína celular) inhibe la función normal de pRb

4. La presencia de la proteína 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 T. P y col., 1986; Dunn J. M y col., 1989, Horowitz J. M y col., 1990, Blanquet V y col., 1995, Lohmann D y col., 1996*)

Por otro lado se observó que en una misma capa nuclear de la retina, había células negativas y positivas con diferente intensidad, este hecho se puede explicar porque las células se podrían encontrar en diferentes fases del ciclo celular, tal y como lo propone Cordon y col., (1994) en donde menciona que este tipo de estudios han sido cruciales para entender los procesos involucrados en el control de la diferenciación celular además del progreso del tumor (*Cordon-Cardon y col., 1994*)

En el caso de retinoblastomas, sólo se cuenta con un trabajo (*Yuge y col., 1995*), en el cual se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-proteína retinoblastoma y en ninguno de los tumores se identificó la proteína pRb, esto no coincide con lo que se obtuvo en este trabajo. Una de las consideraciones que se debe hacer al respecto es que no se tiene información hacia donde se dirige el anticuerpo usado por Yuge ya que en nuestro caso el anticuerpo estaba dirigido contra el carboxilo terminal, además tampoco se tiene información del estado de fosforilación de la pRb que se detectó

Con la finalidad de extender el conocimiento acerca del tipo de alteraciones moleculares en el gen RB1 en pacientes con retinoblastoma de nuestra población, es necesario analizar otros exones, que codifican para dominios funcionales de la proteína pRb. Es importante

además el análisis de un mayor número de pacientes lo que permitira conocer la frecuencia de mutaciones. Además es importante hacer un análisis inmunohistoquímico con un anticuerpo que nos permita diferenciar entre ambas formas fosforiladas de la proteína pRb.

## VIII. CONCLUSIONES

1. Los resultados indican que las mutaciones puntuales, son el tipo de alteración más frecuente en el gen Rb1 en los pacientes analizados con retinoblastoma, éstas se identificaron en 3 de 19 pacientes (15.7%).

2. Posiblemente en nuestra población podrían existir otros exones más frecuentemente alterados, diferentes a los reportados en la bibliografía (como se ha visto en otros genes como DMD), ya que sólo se encontró mutación (en los exones 8, 18 y 20) en 3 de 19 pacientes analizados.

3 La presencia de la proteína pRb en los tumores no indica necesariamente que este funcionando de manera normal, ya que puede estar presente en su forma inactiva. Además debe tenerse en cuenta que la alteración del gen Rb1 no es el único mecanismo que predispone al desarrollo de retinoblastoma.

## IX. BIBLIOGRAFIA

- Baldi A., Boccia V., Claudio P. P., De Luca A. and Giordano A. (1996). Genomic structure of the human retinoblastoma-related Rb2/p130 gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **93**:4629-4632.
- Blanquet V., Turleau C., Gross S. M., Goossens M. and Besmond C. (1993). Identification of germline mutations in the RB1 gene by denaturant gradient gel electrophoresis and polymerase chain reaction direct sequencing. *Hum Mol Genet* **7**:975-979
- Blanquet V., Gross S. M., Turleau C., Beaufort S. C., Doz F. and Besmond C. (1994). Three novel germline mutations in exons 8 and 18 of the retinoblastoma gene. *Hum Mol Genet* **7**:1185-1186.
- Blanquet V., Turleau C., Gross M. M., S narnaud B. C., Doz F. and Besmond C. (1995). Spectrum of germline mutation in the RB1 gene. a study of 232 patients with hereditary and non hereditary retinoblastoma. *Hum Mol Genet* **4**:383-388
- Bookstein R., Shew Y. J., Chen L. P., Scully P. and Lee H. W. (1990) Suppression of tumorigenicity of human prostate carcinoma cells by replacing a mutated Rb gene. *Science.* **247**:712-716.
- Brehm A., Miska E. A., McCance D. J., Reid J. L., Bannister A. J. and Kouzarides T. (1998). Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature.* **391**:597-600
- Cardo C. C. and Richon M. V. (1994) Expression of the retinoblastoma protein is regulated in normal human tissues. *Am J Pathol.* **144**:500-510
- Carlson E., Letson R., Ramsay K. and Desnik R. (1979). Factors for improved genetic counseling for retinoblastoma based on a survey of 55 families. *Am. J. Ophthalmol.* **87**:449-459

Cavenee W. K., Dryja T. P., Phillips R. A., Benedict W. F., Godbout R., Gallie B. L., Murphree A. L., Strong L. C. and White R. L. (1983). Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma *Nature*. **305**:779-784

Cavenee W. K., Hansen, M., Nordenskjold M., Kock E., Maumenee I., Squire J., Phillips R., Gallie B. (1985). Genetic origin of mutations predisposing to retinoblastoma *Science* **228**:1051

Claudio P. P., Howard M. C., Baldi A., De Luca A., Fu Y., Condorelli G., Sun Y., Colburn N., Calabreta B. and Giordano A. (1994) p130/pRb2 has growth suppressive properties similar to yet distinctive from those of retinoblastoma family members pRb and p107. *Cancer Res.* **54**:5556-5560.

Cowell K. J., Jaju R. and Kempinski H. (1994). Isolation and characterisation of a panel of cosmids which allows unequivocal identification of chromosome deletions involving the RB1 gene using fluorescence in situ hybridisation *J. Med. Genet.* **31**:334-337.

Cowell J. K., Smith T. and Bia B. (1996). Frequent constitutional C to T mutations in CGA-arginine codons in the RB1 gene produce premature stop codons in patients with bilateral (hereditary) retinoblastoma. *Eur. J. Hum. Genet.* **2**:281-290.

Doz F., Peter M., Schleiermacher G., Vielh P., Validire P., Putterman M., Blanquet V., Desjardins L., Dufier J. L., Zucker J. M., Mosseri V., Thomas G., Magdelénat H. and Deiatre O. (1996). N-MYC amplification, loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 1 and DNA ploidy in retinoblastoma *Eur J Cancer.* **32**:645-649

Dryja T. P., Rapaport J. M., Joyce J. M. and Petersen R. A. (1986). Molecular detection of deletions involving band q14 of chromosome 13 in retinoblastomas *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:7391-7394.

Dryja T. P., Mukai S., Petersen R., Rapaport J. M., Walton D. and Yandell D. W. (1989). Parental origin of mutations of the retinoblastoma gene *Nature* **339**:556-558

Dryja T. P., Rapaport J., McGee T. L., Nork T. M. and Schwartz T. L. (1993). Molecular Etiology of Low-Penetrance Retinoblastoma in Two Pedigrees. *Am. J. Hum. Genet.* **52**:1122-1128.

Dryja T., Morrow J. and Rapaport M. (1997). Quantification of the paternal allele bias for new germline mutations in the retinoblastoma gene. *Hum Genet* **100**:446-449.

Dunn J. M., Phillips R. A., Zhu X., Becker A. and Gallie B. L. (1989) Mutations in the Rb1 gene and their effects on transcription. *Mol Cell Biol.* **9** 4596-4604

Field S. J., Tsai F. Y., Kuo F., Zubiaga A. M., Kaelin W. G., Livingston D. M., Orkin S. H. and Greenberg M. E. (1996) E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation. *Cell.* **85**:549-561.

Friend S. H., Bernards R., Rogelj S., Weinberg R. A., Rapaport J. M., Albert D. M. and Dryja T. P. (1986). A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* **323**:643-646

Geradts J., Hu S. X., Lincoln E. C., Benedict F. W. and Xu J. H. (1994). Aberrant RB gene expression in routinely processed, archival tumor tissues determined by three different anti-RB antibodies. *Int. J. Cancer.* **58**:161-167.

Gallie B. L., Squire J. A., Goddard A., Dunn J. M., Canton M., Hinton D., Zhu X. and Phillips R. A. (1990). Biology of disease: Mechanism of oncogenesis in retinoblastoma. *Lab Invest.* **62**:394-408

Gallie B. L. (1997) Predictive testing for retinoblastoma comes of age. *Am. J. Hum. Genet.* **61**:279-281

Gibson T. J., Thompson J.D., Blocker A. and Kouzarides T. (1994) Evidence for a protein domain superfamily shared by the cyclins, TFIIB and RB/p107. *Nucleic Acids Res.* **22**:946-952.

Girardet A., McPeck S. M., Leeflang P. E., Munier F., Arnheim N., Claustres M. and Pellestor F. (2000). Meiotic segregation analysis of Rb1 alleles in retinoblastoma pedigrees by use of single-sperm typing. *Am. J. Hum. Genet.* **66**:167-175

Glavac D. and Dean M. (1993). Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Hum Mut.* **2**:404-414.

Goodrich W. D. and Lee H. W. (1993). Molecular characterization of the retinoblastoma susceptibility gene. *B. B. Acta.* **1155**:43-61

Hall F. L., Williams R.T., Wu L., Wu F., Carbonaro H. D.A. and Harper J.W. (1993). Two potentially oncogenic cyclins, cyclin A and cyclin D1, share common properties of subunit configuration, tyrosine phosphorylation and physical association with the Rb protein. *Oncogene* **8**:1377-1384.

Hamel A. P., Gallie L. B. and Phillips A. R. (1992). The retinoblastoma protein and cell cycle regulation. *TIG.* **8**:180-185.

Harbour J. W., Lai S. L., Peng J. W., Gazdar A. F., Minna J. D. and Kaye F. J. (1988). Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science.* **241**:353-356.

Hayashi K. and Yandell D. W. (1993). How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mut.* **2**:338-346

Hensel Ch. H., Hsieh Ch. L., Gazdar A. F., Johnson B. E., Sakaguchi A. Y., Naylor S. L., Lee W. H. and Lee E. Y. H. P. (1990). Altered structure and expression of the human retinoblastoma susceptibility. *Cancer Res.* **50**:3067-3072

Hogg A., Britta B., Onadium Z. and Cowell K. J. (1993). Molecular mechanisms of oncogenic mutations in tumors from patients with bilateral and unilateral retinoblastoma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**:7351-7355

Hooper M. L., (1999) Is sunlight an aetiological agent in the genesis of retinoblastoma? *Br J Cancer.* 79 1273-1276

Horowitz J. M., Park S. O., Bogenmann E., Cheng J. Ch., Yandell d. W., Kaye F. J., Minna J. D., Dryja T. P. and Weinberg R. A. (1990). Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2775-2779

Janson M. and Nordenskjöld M. (1994). A constitutional mutation within the retinoblastoma gene detected by PFGE *Clin. Genet* 45:5-10

Jaulin L. M., Groisman R., Naguibneva I., Robin P., Lorain S., Le Villan J. P., Troalen F., Trouche D. and Bellan A. H. (1998). Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature.* 391:601-604

Jiang Z., Zacksenhaus E., Gallie L. B. and Phillips A. R. (1997). The retinoblastoma gene family is differentially expressed during embryogenesis. *Oncogene* 14:1789-1797.

Jones C., Booth C., Rita D., Jazmines L., Brandt B., Newlan A. and Horsthemke B. (1997). Bilateral retinoblastoma in a male patient with an X;13 translocation: Evidence for silencing of the Rb1 gene by the spreading of X inactivation. *Am J. Hum. Genet.* 60 1558-1562.

Kaneko S., Nishioka J., Tanaka M., Nakashima K. and Nobori T. (1999). Transcriptional regulation of the CDK inhibitor p16INK4a gene by a novel pRb-associated repressor, RBAR1. *Biochem Mol Biol. Int.* 47:205-215.

Kato V. M., Ishizaki K., Toguchida J., Kaneko A., Takayama J., Tanooka H., Kato T., Shimizu T. and Sasaki S. (1994). Mutations in the retinoblastoma gene and their expression in somatic and tumor cells of patients with hereditary retinoblastoma. *Hum Mut* 3:44-51.

Kato V. M., Ishizaki K., Shimizu T., Ejima Y., Tanooka H., Takayama J., Kaneko A., Toguchida J., Kato T., and Sasaki S. (1994) Parental origin of germ-line and somatic mutations in the retinoblastoma gene *Hum Genet* 94:31-38

Kempton K. (1992). Quick preparation of high molecular weight DNA by freezing. *TIG*. **8**:226-227

Klutzn M. Horsthemke B. and Lohmann D. R. (1999). RB1 gene mutations in peripheral DNA of patients with isolated unilateral retinoblastoma. *Am. J. Genet.* **64**:667-668

Knudson A. G. (1971). Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **68** 820-823

Koenen, M. (1989) Recovery of DNA from agarose gels using liquid nitrogen. *TIG* **5** 137.

Kogan H. A. D., Kogan C. S., Levi D., Dazi P., T'Ang A., Fung T. K. Y. and Israel A. M. (1995). Inhibition of apoptosis by the retinoblastoma gene product. *EMBO J.* **14** 461-472.

Kyritsis A. P., Tsokos M., Triche T. J. and Chader G. J. (1984). Retinoblastoma origin from a primitive neuroectodermal cell. *Nature* **307** 471-473.

Lee W. W., Bookstein R., Hong F., Young L. J., Shew J. Y. and Lee H. Y. (1987). Human retinoblastoma susceptibility gene. Cloning, identification and sequence. *Science* **235**:1394-1399.

Lohmann D., Horsthemke B., Gillessen K. G., Stefani F. and Hofler H. (1992). Detection of small RB1 gene deletions in retinoblastoma by multiplex PCR and high resolution gel electrophoresis. *Hum Genet.* **89**:49-53.

Lohmann D., Brandt B., Hopping W., Passarge E. and Horsthemke B. (1994). Spectrum of small length germline mutations in the RB1 gene. *Hum Mol Genet.* **3**:2187-2193.

Lohmann D., Brandt B., Hopping W., Passarge E. and Horsthemke B. (1996). The spectrum of RB1 germ-line mutations in hereditary retinoblastoma. *Am. J. Hum Genet* **58**:940-949.

- Lohmann D R, Gerick M, Brandt B, Oelschlager U, Lorenz B, Passarge E and Horsthemke B, (1997) Constitutional RB1 gene mutations in patients with isolated unilateral retinoblastoma. *Am. J. Hum. Genet.* **61** 282-294.
- Mancini D, Sing S., Ainsworth P. and Rodenhiser. (1997) Constitutively methylated CpG dinucleotides as mutation hot spot in the retinoblastoma gene (RB1). *Am. J Hum. Genet* **61**:80-87.
- Maniatis T., Fritsch E F. and Sambrook J (1989) A laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Martinez R. G., Leal A C, Luna R R., Cardenas S R., Martinez B A and Medina A. (1995) Los aspectos epidemiológicos en el retinoblastoma bilateral *Gac. Méd. Méx.* **131**.527-531
- Martins M. L. and Earnshaw C. W (1997). Apoptosis: alive and kicking in 1997 *TICB* **7**:111-114
- Mohar A., Mendivil M M, Suchil B L, Macías M. T. and Garza J. G (1997). Epidemiología descriptiva de cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología de México *Sal. Pub Mex.* **39**.253-258
- Molnar M, Stefansson K., Marton L., Tripathi R. and Molnar G. (1984). Immunohistochemistry of retinoblastomas in humans. *Am J. Ophthalmol.* **97**.301-307.
- Motegi T., Komatsu M. and Minoda K (1983) Is the interstitial deletion of 13q in retinoblastoma patients not transmissible? *Hum. Genet.* **64**:205
- Mulligan G. and Jacks T (1998) The retinoblastoma gene family. cousins with overlapping interests. *TIG* **14**:No. 6.
- Munier L. F., Arabien L. Flodman P., Spence A. M., Pescia G., Rutz P H. and Murphree L. A (1994). Putative non-Mendelian transmission of retinoblastoma in males a phenotypic segregation analysis of 150 pedigrees *Hum Genet* **94** 484-490

Munier F L., Thonney F , Girardet A , Balmer A , Claustre M , Pellestor F , Senn A , Pescia G and Schorderet D F. (1998) Evidence of somatic and germinal mosaicism in pseudo-low-penetrant hereditary retinoblastoma, by constitutional and single-sperm mutation analysis. *Am. J. Hum. Genet.* **63**:1903-1908.

Naumova A , Hansen M , Strong L , Jones A., Hadjstilianou D., Mastrangelo D., Griegel S., Rajewsky M., Shields J., Donoso L , Wang M. and Sapienza C (1994a). Concordance between parental origin of chromosome 13q loss and chromosome 6p duplication in sporadic retinoblastoma. *Am. J. Hum. Genet.* **54**:274-281

Naumova A and Sapienza C. (1994b). The genetics of retinoblastoma, Revisited. *Am. J. Hum Genet.* **54**:264-273.

Nichols W W., Miller R C , Sobel M , Hoffman E , Sparkes R. S., Mohandas T , Veomett I. and Davis J. R. (1980). Further observations on a 13q Xp translocation associated with retinoblastoma *Am. J. Ophthal* **89**:621-627.

Onadim Z , Hogg A., Baird N P and Cowell K. J. (1992). Oncogenic point mutations in exon 20 of the RB1 gene in families showing incomplete penetrance and mild expression of the retinoblastoma phenotype. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **89**: 6177-6181.

Ortiz B J., Sánchez M. H and Gutierrez F. A. (1996). Algunas características epidemiológicas del retinoblastoma en niños residentes del Distrito Federal *Bol. Med. Hosp Infant Mex* **53**:234-239

Otterson A. G., Modi S , Nguyen K , Amy B., Coxon and Kaye J F (1999). Temperature-sensitive RB mutations linked to incomplete penetrance of familial retinoblastoma in 12 familias *Am. J. Hum Genet* **65**:1040-1046.

Pam V. A., Mohammed I and Olali C. A. (1998) Retinoblastoma in an adult: a case report *West. Afr J Med.* **17**:280-283.

Popoff N. and Ellsworth R (1971). The fine structure of retinoblastoma. *Lab. Invest.* **25**:389-402

Sakai T , Ohtani N., McGee I T , Robbins D P and Dryja P. D (1991). Oncogenic germ-line mutations in Sp1 and ATF sites in the human retinoblastoma gene. *Nature* **353**:83-86.

Salamanca G. F., Luengas F and Antillón F (1984). Genetic and cytogenetic studies in children with retinoblastoma. *Cancer Genet and Cytogenet* **13**:129-138.

Salamanca G. F. (1990). Citogenética Humana: Fundamentos y aplicaciones clínicas. Ed. Médica Panamericana.

Scriver Ch. R., Beaudet A. L., Sly W S. and Valle D. (1995). Retinoblastoma, in the metabolic and molecular bases of inherited disease. McGraw-Hill, Inc. Vol I. p613.

Seabright M (1971) A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet.* **2**:971.

Simon J. and Heider K. (1996) Expression of CD44 isoforms in human skin cancer. *Eur J Cancer* **8**:1394-1400.

Sippel K C., Fraioli R. E , Smith G D , Schalkoff M. E., Sutherland J , Gallie B. L. and Dryja T. P. (1998). Frequency of somatic and germ-line mosaicism in retinoblastoma: Implications for genetic counseling. *Am. J. Hum. Genet.* **62**:610-619.

Sorsby A. (1972) Bilateral retinoblastoma: A dominantly inherited affection. *Brit. Med. J.* **2**:580-583.

Stahl A., Levy N , Wadzynska Thérèse, Sussan J M , Jourdan F D and Saracco J. B. (1994). The genetics of retinoblastoma. *Ann. Génét* **37**:172- 178.

Stirzaker C , Millar D S., Paul Ch L , Warnecke P. M., Harrison J Vincent P C , Frommer M. and Clark S J. (1997). Extensive DNA methylation spanning the Rb promoter in retinoblastoma tumors *Cancer Res* **57**:2229-2237

- Strong L C , Ricarddi V M , Ferell R E and Sparkes R S. (1981) Familial retinoblastoma and chromosome 13 deletion transmitted via an insertional translocation. *Science*. **213** 1501-1503
- Taya Y. (1997) RB kinases and RB-binding proteins: new points of view. *TIBS*. **22**.14-17
- Terpe H., Stark H , Prehm P and Günthert O. (1994) CD44 variant isoforms are expressed in basal epithelia of non-malignant human fetal and adult tissues. *Histochemistry* **101** 79-89.
- Trichopoulos D., Li F. P. and Hunter D J (1996) What causes cancer? *Sci Am*. **275**:32-40
- T'so M., Zimmerman i. and Fine B (1970) The nature of retinoblastoma. I. Photoreceptor differentiation a clinical and histopathologic study *Am J. Ophthalmol.* **69**.339-349
- Tsuzuki T., Tsunoda S , Sakaki T., Konishi N., Hiasa Y and Nakamura M. (1996). Alterations of retinoblastoma, p53, p16 (CDKN2), and p15 genes in human astrocytomas. *Am Cancer Society*. **78**:287-293.
- Verma R. S and Babu Arvind. (1995). Human Chromosomes: Principles and techniques Second Edition McGraw-Hill.
- Viegas P. E , Dutrillaux, B. (1978) Une methode simple pour obtenir des prophases et des prometaphases. *Ann. Génét.* **21**.122.
- Wang J. Y. J. (1997) Retinoblastoma protein in growth supression and death protection. *Curr Opin in Genet & Develop.* **7**:39-45.
- Weinberg A R. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control *Cell* **81**:323 330.
- Weinberg A R (1996) How Cancer Arises?. *Sci Am* **275**:32-40.

- Wright D. K and Manos M. M. (1990) Sample preparation from paraffin embedded tissues. In *PCR Protocols. A guide to methods and applications*, Edited por Innis M.A , Gelfand M. A., Smirsky J J., White T. J. Academic Press. pp. 153-158.
- Xu J H, Hu X S., Cagle T P., Moore E. G. and Benedict F. (1991) Absence of retinoblastoma protein expression in primary non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res* **51**:2735-2739
- Yamamoto M , Yoshida M , Ono K , Fujita T , Ohtani F N. and Sakai T (1994) Effect of tumor suppressors on cell cycle-regulatory genes Rb suppresses p34 cdc2 expression and normal p53 suppresses cyclin A expression. *Exp Cell Res.* **210**:94-101.
- Yen A., and Varvayanis S. (1994). Late dephosphorylation of the Rb protein in G2 during the process of induced cell differentiation. *Exp. Cell. Res* **214**:250-257
- Yuge K., Nakajima M, Uemura Y , Miki H., Uyama M. and Tsubura A. (1995). Immunohistochemical features of the human retina and retinoblastoma. *Virchows Arch.* **426**:571-575
- Yunis, J. (1976). High resolution of human chromosome. *Science* **191** 1268-1270.
- Yunis J. J. and Ramsa Y. N (1978). Retinoblastoma and subband deletion of chromosome 13. *Am. J Dis. Child.* **132**:161-163.
- Zhang K. and Kumar R. (1994). Interferon-alpha inhibits cyclin E- and cyclin D1-dependent CDK-2 kinase activity associated with Rb protein and E2F in Daudi cells *Biochem Biophys Res Commun* **200**:522-528
- Zhu X, Dunn, J., Phillips R., Goddard A , Paton K , Becker A and Gallie B. (1989). Preferential germline mutation of the paternal allele in retinoblastoma. *Nature* **340**.312-313.
- Zucker J M., Desjardins L and Doz F (1998) Retinoblastoma. *Eur J Cancer* **34**:1045-1049.