

00346



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

6

"DETECCION DE MUTACIONES EN LA REGION
PROMOTORA DEL GEN DEL RETINOBLASTOMA (RB-1)"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:
**MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)**
P R E S E N T A
BIOL. PEDRO CUAPIO PADILLA

294729

DIRECTOR DE TESIS: M. en B.E. MIGUEL MACIAS VEGA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

➤ A Dios,

Por ser mi guía y enseñarme el camino de la vida, por ese apoyo en los momentos de flaqueza y por permitirme salir adelante.

➤ A Silvia y Silvia Azul,

A mis más grandes tesoros que la vida me ha dado, su cariño y amor son la base de mi vida, ya que son la fuente de inspiración para que salga adelante.

➤ A Silvia,

Por tu amor, cariño, dedicación y comprensión, por ser una esposa intachable, cariñosa, comprensible, amorosa y ser la luz de mi vida; por todo el apoyo incondicional que me has dado en esta vida mil gracias mi amor. Te amo y siempre te amare, por que te llevo en mi corazón y pensamiento siempre; que dios te bendiga.

➤ A Silvia Azul,

Por ser el regalo más lindo y hermoso que dios me a concedió, ya que con tu presencia has iluminado mi vida y le has dado otro sentido, gracias por tu cariño, mi hija adorada, que dios te bendiga y siempre este contigo.

➤ **A la memoria de mi padre, Pedro Cuapio Cortes**

A quien le debo todo lo que soy, ya que con cariño, amor, dedicación y sacrificio me permitieron salir adelante, siendo un ejemplo siempre a seguir, gracias, en donde quieras que estés, te quiero Papá, siempre estarás en mi corazón y tu recuerdo vivirá en mí para toda la vida.

➤ **A mi madre, Bertha Lilia Padilla**

Por su apoyo, amor y cariño, a quien luchó y sacrificó parte de su vida para sacarme adelante, mil gracias, por estar cuando te necesito, te quiero mamá, siempre estás en mi corazón.

➤ **A mis hermanos, Fidencio, Vanessa y Bertha Lilia**

Con quienes he compartido tantos momentos de alegrías y felicidad en mi vida, gracias por el apoyo que siempre me han dado, los quiero mucho y siempre estaré con ustedes.

➤ **A mi abuelita Paz Cortes**

Por ser una mujer excelente, cariñosa y amorosa, porque gracias a ti abuelita mi niñez fue muy hermosa en Sta. María Acuitlapilco (Tlaxcala), siempre tendrás un lugar muy especial en mi corazón, que dios te bendiga.

➤ **A la memoria de mi abuelo Fidencio Cuapio Sánchez**

Por todo el amor y comprensión que me brindaste de pequeño y con ello tener una infancia muy especial en Tlaxcala, mil gracias abuelito, siempre estas conmigo.

➤ **A la memoria de mi abuelita Amalia Padilla Magaña**

Por ser un segundo padre, por darme tu cariño cuando más lo necesite, porque con tu amor y comprensión me sacaste adelante, mil gracias abuelita, siempre estarás conmigo.

➤ **A la memoria de Jesús Lemus López**

Por compartir tu vida con mi abuelita y conmigo, gracias por todos los buenos momentos que me ofreciste.

➤ **A mi familia (Andrea, Isis Yazmín, Nayeli y Jaime).**

Por su apoyo y cariño, gracias por ser mi familia.

➤ **A mi pequeña nueva familia (Alejandra, Paola, Rodolfo, Eloisa, Jacobo, Dona, Ilusión, Alfonso, Carlos, Diana, Gabriela, Cintia, Angélica, Karen, Diego, Rodolfo, Eloy, Gloria, Serafín, Hilda, Manuel, Sonia, Rosalba, Olga, Jacoba, Esther, José Luis y Damaso).**

Gracias por ser como son, además de su apoyo y cariño.

➤ **Muy en especial a mis suegros Perpetua Mendoza Castillo e Idelfonso Ramos González,**

Por ser unas grandes personas, cuyo apoyo ha sido fundamental para mí y mi familia, mil gracias, los estimo mucho y que dios los colme de bendiciones.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR, DEPARTAMENTO DE GENETICA HUMANA, DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA (I.N.P.), BAJO LA ASESORIA DEL M. EN B. E. MIGUEL MACIAS VEGA

AGRADECIMIENTOS

- Al M. en B.E. Miguel Macias Vega, por la excelente dirección de tesis, así como el apoyo, confianza y amistad que me ha brindado.
- A mis sinodales: Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo, Dr. Luis Felipe Jiménez García, Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano, M. en B.E. Miguel Macias Vega, M. en C. Yolanda Saldaña Álvarez, M. en C. América del Pilar Mandujano Martínez y M. en I.B.B. Hiram Olivera Díaz, por sus consejos y comentarios que sirvieron para enriquecer este trabajo.

Al personal del Instituto Nacional de Pediatría (I.N.P.) por el apoyo brindado durante mi estancia, en especial al:

- Biól. Manuel Moreno Corona.
- M. en C. Francisco García Vázquez.
- M. en C. Rafael Velázquez.
- M. en C. Cesárea Bermúdez.
- M. en C. Margarita Saldaña.
- M. en C. Miguel Ángel Alcántara.
- Biól. Elizabeth Hernández.
- Q.F.B. Ricardo Lee
- T. L. Araceli Romero.
- Srta. Dalia V. Tovar.

- Al CONACYT por el apoyo brindado al proyecto con numero de registro 30714-M.
- A los profesores, compañeros y amigos de la Maestría en Ciencias (Biología Celular) por compartir su amistad y conocimientos.
- A la Sección IV Sindical del I.S.S.S.T.E., por el apoyo y las facilidades proporcionadas en la obtención de la beca para la realización de los estudios de posgrado, en especial a:
 - * Dra. Norma Lilitiana Rodríguez Argüelles .
(Secretaria General Sección IV)
 - * Q.B.P. Fernando Alvarado Sánchez.
 - * Claudia I. Ortega Soto.
 - * Enf. Martha Beceron Medina.
 - * Dr. David González Montiel.
 - * Dr. Joaquín Blanco Mirón.
- Al Dr. José Luis Gómez Márquez y Dra. Bertha Peña Mendoza, por su amistad, consejos y apoyos brindados desde la licenciatura, muchas gracias de parte de la familia Cuapio Ramos.
- A mis amigos y compañeros del Laboratorio del Centro de Apoyo Diagnostico (C.A.D.) San Rafael del I.S.S.S.T.E., por su amistad, confianza, comprensión y apoyos brindados, Gracias.

**“DETECCIÓN DE MUTACIONES EN LA REGIÓN PROMOTORA
DEL GEN DEL RETINOBLASTOMA (RB-1)”**

**Un agradecimiento al CONACYT por el apoyo brindado al proyecto
con numero de registro 30714-M.**

ÍNDICE

	Pag.
Glosario y abreviaciones.....	4
Relación de figuras.....	6
Relación de tablas.....	7
Resumen.....	8
Introducción.....	9
I. Retinoblastoma.....	9
II. Genética Molecular del gen RB-1.....	14
III. Fosfoproteína pRB110.....	15
IV. La pRB110 en el ciclo celular.....	18
V. Función del promotor en la expresión del gen RB1.....	21
VI. Mutaciones en el gen RB-1.....	22
Justificación.....	24
Antecedentes.....	24
Hipótesis.....	24
Objetivo.....	24
Objetivos particulares.....	25
VII. Estrategia general.....	25
VIII. Metodología.....	27
1.- Obtención de DNA.....	27
2. - Purificación de DNA.....	27
3.- Cuantificación de DNA.....	28

4.- Integridad de DNA.....	28
5.- Síntesis de oligonucleótidos	29
6.- Amplificación utilizando el PCR	30
7.- Técnica de SSCP	30
8.- Electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturizante ...	30
9.- Autorradiografía	31
IX. Descripción de las técnicas utilizadas	32
Síntesis de oligonucleótidos	32
PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)	34
SSCP (Análisis de polimorfismo conformacional de cadena sencilla) .	38
X.- Resultados	41
Hallazgos clínicos	41
Población de estudio	42
Formación del banco de DNA	43
Amplificación por PCR	43
Condiciones para SSCP	48
XI. Discusión	52
XII. Conclusiones	59
XIII. Referencias	60
Anexo 1 Preparación de reactivos	65
Anexo 2 Equipo	68

Glosario y abreviaciones

Abreviación	Significado
RB	Retinoblastoma
LOH	Loss of Heterocigoty; pérdida de heterocigocidad
RB1	Gen retinoblastoma humano
13q14.1	Locus del gen retinoblastoma humano
kb	Kilobases
pRB110	Fosfoproteína RB de 110 kd
kd	Kilodaltones
E2F	Factor 2 promotor de la transcripción
Cdks	Cinasas dependientes de ciclinas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SSCP	Single strand conformation polymorphism; Polimorfismo conformacional de cadena sencilla
INP	Instituto Nacional de Pediatría
ng	Nanogramos
RCBL	Red cells blood lisis; solución de lisis para células rojas
WCBL	White cells blood lisis: solución de lisis para células blancas (proteínasa K)
ml	Mililitros
µl	Microlitros
rpm	Revoluciones por minuto

Relación de figuras

Figura	Pag.
1.- Ley de Knudson	11
2.- Esquema del cromosoma 13 con la técnica de tinción de las bandas G	16
3.- Mapa del gen de retinoblastoma humano	17
4.- Estructura de la proteína pRB110	19
5.- La proteína pRB110 en el ciclo celular	20
6.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	36
7.- Detección de polimorfismos por la técnica de SSCP	40
8.- Integridad del DNA de pacientes	44
9.- Pruebas de amplificación para el promotor	46
10.- Amplificación del promotor para las muestras de pacientes con RB	47
11.- Patrón de SSCP para el promotor de RB	50
12.- Patrón de SSCP para el exon 4 de RB	51
13.- Metilación del sitio de E2F	58

Relación de tablas

Tabla	Pag.
1.- Características del retinoblastoma	10
2.- Oligonucleótidos utilizados para amplificar la región promotora del gen RB	29
3.- Población en estudio con retinoblastoma	41
4.- Datos oculares en pacientes con retinoblastoma	42
5.- Edad inicial del padecimiento	42
6.- Condiciones para el PCR	45
7.- Programa de amplificación para secuencia geonómica de RB	45
8.- Condiciones para SSCP	49
9.- Programa de amplificación para SSCP	49

RESUMEN

El retinoblastoma (RB) es una neoplasia maligna de origen embrionario con una incidencia de 1 en 20,000 nacidos vivos; 40% de los casos son hereditarios y manifiestan el tumor de manera bilateral, el 60% no son hereditarios y generalmente presentan el tumor de manera unilateral, cerca del 15% de los casos hereditarios también presentan el tumor de manera unilateral lo cual representa un problema cuando se pretende realizar un diagnóstico clínico que permita diferenciar entre la forma unilateral hereditaria y la no-hereditaria. Esta neoplasia se hereda con un patrón autosómico dominante y una penetrancia del 90%.

El gen del retinoblastoma (RB-1) se localiza en el brazo largo del cromosoma 13, contiene 27 exones y codifica para la fosfoproteína pRB110 que participa en la regulación negativa del ciclo, de tal manera que su inactivación es responsable en la mayoría de los casos del desarrollo del tumor. A nivel molecular el gen RB-1 funciona como un supresor de tumores, se han descrito mutaciones en la secuencia de la región promotora que inhiben la expresión del mismo, por lo tanto cualquier alteración en ésta región suprime la síntesis de la proteína pRB110 lo que dispara el mecanismo que conduce al desarrollo del tumor.

Por lo antes expuesto es imprescindible caracterizar la región promotora de pacientes con diagnóstico clínico e histopatológico de RB, lo cual permitirá establecer estrategias encaminadas a un manejo preventivo y un asesoramiento genético de certeza de pacientes afectados y a familiares de 1er grado.

El objetivo general de este trabajo fue analizar la región promotora del gen RB-1 mediante técnicas de biología molecular. Para ello se creó un banco de DNA de sangre periférica de 50 pacientes con diagnóstico clínico e histopatológico de retinoblastoma. Se estandarizaron y aplicaron las metodologías moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el análisis del polimorfismo conformacional de cadenas sencilla de DNA (SSCP) que permiten detectar mutaciones en el genoma del orden de una y hasta 1000 pb.

De los 50 pacientes estudiados en ninguno se encontraron mutaciones en la región promotora del gen RB1, esto permite suponer entonces que existen otro tipo de factores que favorecen el desarrollo del tumor debido a la nula o baja expresión de la proteína pRB110; existen evidencias experimentales que sugieren otros factores tales como : a) la metilación en las islas CpG de la región promotora, b) la presencia de proteínas que interfieren con la fosforilación y desfosforilación de la proteína pRB110 durante el ciclo celular y c) moléculas que inhiben la actividad del factor de transcripción E2F y que pueden participar en la etiología de esta enfermedad.

INTRODUCCION

I. RETINOBLASTOMA

El retinoblastoma es un tumor maligno de la infancia que puede ser letal, se presenta generalmente antes de los cinco años de edad, se transmite con un patrón de herencia autosómico dominante y una penetrancia del 90%. Tiene una frecuencia a nivel mundial de 1 en 20,000 recién nacidos vivos (Blanquet, et al, 1991, 1994).

Clínicamente el tumor se identifica principalmente por la presencia de leucocoria, y en menor proporción por estrabismo y signos inflamatorios oculares. Existen dos formas de la enfermedad hereditario y no hereditario, el 40% de los casos son hereditarios y el 60 % no son hereditarios, la forma hereditaria se caracteriza por que la enfermedad se manifiesta antes del primer año de edad y por presentar el tumor de manera bilateral, mientras que la no hereditaria se identifica por que la enfermedad se evidencia después del primer año de edad y el tumor se presenta generalmente de manera unilateral. No obstante del 10 al 15% de los casos con la forma hereditaria también presentan el tumor de manera unilateral (Díaz, et al, 1992) (**Tabla 1**).

De acuerdo con un análisis del retinoblastoma, Knudson (1971, 1996) demostró que éste es un cáncer causado por dos eventos mutacionales, como resultado de los cuales ambos alelos del gen responsables del RB se inactivan y conducen al desarrollo del tumor (**Figura 1**). En el RB hereditario la inactivación

del primer alelo ocurre en las células germinales mientras que la inactivación del segundo alelo se presenta sólo en las células de la retina; en el RB no hereditario ambas mutaciones ocurren exclusivamente en las células de la retina.

Dado que las mutaciones en el segundo alelo pueden ocurrir en distintas células de manera independiente, aquellos individuos con RB hereditario generalmente presentan tumores múltiples en un sólo ojo, mientras que en la forma no hereditaria comúnmente se observa un solo tumor en el ojo afectado (Thoney, 1996; Lohmann, 1994, 1997).

TABLA 1 CARACTERÍSTICAS DEL RETINOBLASTOMA	
HEREDITARIO	NO HEREDITARIO
<ul style="list-style-type: none"> ➤ 40 % casos ➤ Inicio temprano (<1 año). ➤ Bilateral (85 – 90 %). ➤ Unilateral (10 – 15 %). ➤ Progenie afectada. ➤ Alto riesgo a desarrollar otras neoplasias. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 60 % casos ➤ Inicio tardío (>1 año). ➤ Unilateral (100 %). ➤ Progenie normal. ➤ Sin riesgo a desarrollar otras neoplasias.
ALTERACIONES GENÉTICAS:	ALTERACIONES GENÉTICAS:
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Mutaciones puntuales ➤ Grandes deleciones ➤ Translocaciones. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Mutaciones puntuales ➤ Grandes deleciones ➤ Translocaciones.

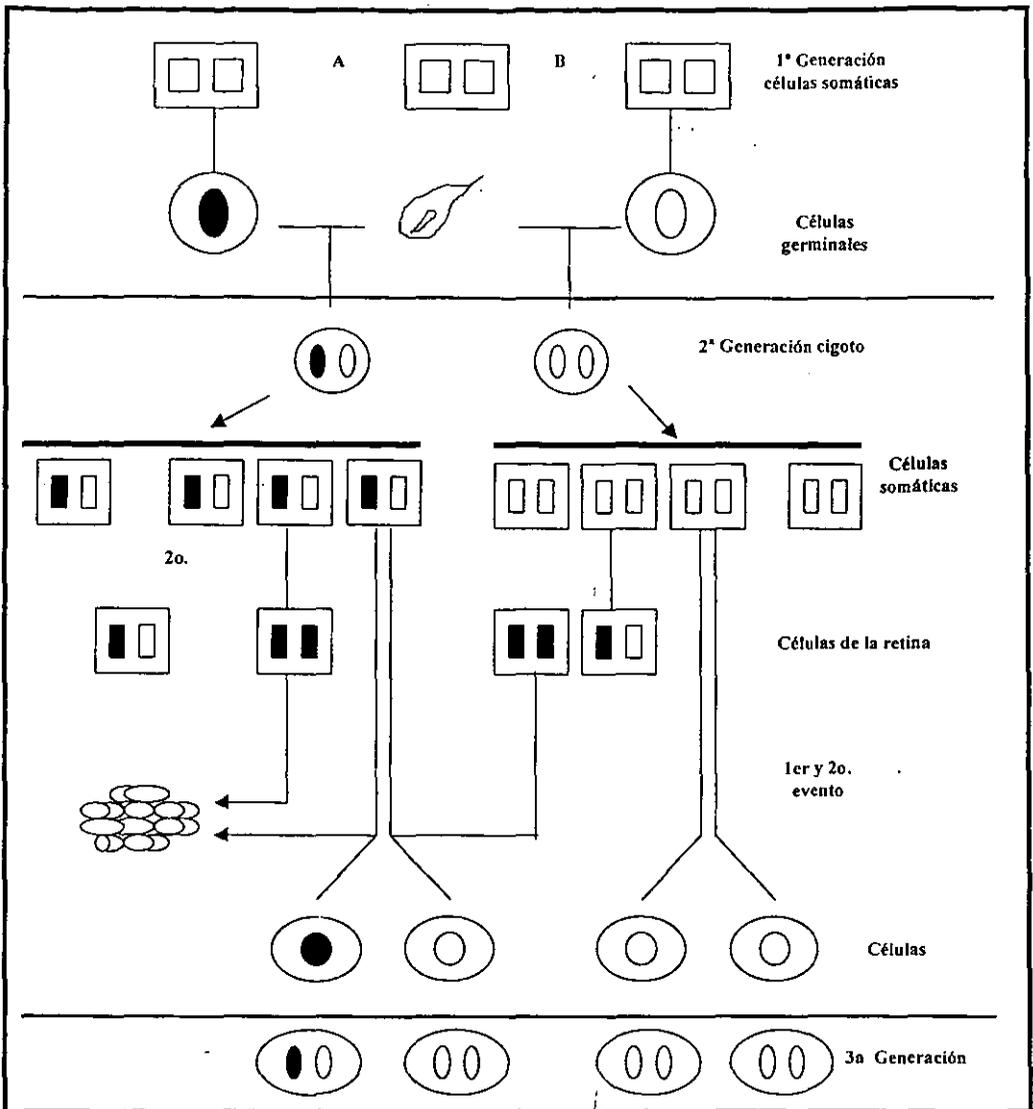


Figura 1.- Ley de Knudson

De acuerdo a esta ley, el retinoblastoma es causado por la inactivación de ambos alelos del gen RB1; **A)** en la forma hereditaria, el 1er. alelo se inactiva en las células germinales y el 2o. alelo se inactiva en las células de la retina; **B)** en la forma no hereditaria los dos alelos se inactivan únicamente en las células de la retina. (Knudson, 1971)

El primer evento mutacional: la mutación que predispone al RB.

De acuerdo con Knudson (1971) el retinoblastoma hereditario se origina a partir de una mutación a nivel germinal que puede presentarse como una mutación *de novo* o ser heredada de uno de los progenitores. Cerca del 95% de las mutaciones germinales son de tipo puntual.

El segundo evento mutacional: la mutación que dispara el proceso tumorigénico.

Una vez que el primer evento mutacional ha ocurrido, la célula se hace heterocigótica por contener dos copias del mismo alelo *rb*, uno normal y otro mutado (*rb/rb-*). Cuando el segundo evento ocurre la célula se hace homocigótica (*rb-/rb-*) para la predisposición a desarrollar el tumor, esto da lugar a un fenómeno denominado pérdida de heterocigocidad, que fisiológicamente se traduce en pérdida de la función del gen RB1, mecanismo necesario para el desarrollo del tumor (Weinber, 1991; Naumova y Sapienza, 1994).

> Pérdida de heterocigocidad.

Actualmente se conocen diferentes mecanismos que a nivel celular causan la pérdida de heterocigocidad (LOH) (Gallie y Joremy, 1990):

➤ **Pérdida de un cromosoma.**

En este proceso la célula es portadora de un cromosoma 13 normal y su homólogo es portador de una mutación; debido a un error en el ciclo de división celular el cromosoma normal se pierde y la célula adquiere la condición de hemicigocidad al quedar con un solo alelo del cromosoma 13 el cual es portador de la mutación.

➤ **Pérdida de un cromosoma y reduplicación del cromosoma restante.**

De la misma manera que en el punto anterior el cromosoma normal se pierde y el cromosoma mutado se reduplica de tal manera que la célula adquiere la homocigocidad del alelo mutado.

➤ **Recombinación mitótica.**

Este proceso puede ocurrir entre un cromosoma normal y su homólogo portador del gen mutado después de ser segregados puede dar lugar a una célula que conserva su heterocigocidad hasta los loci proximales al punto de recombinación, pero adquiere la condición de homocigocidad en los loci distales al punto de recombinación.

➤ **Mutaciones de tipo puntual.**

En condiciones de heterocigocidad basta con que el cromosoma normal sufra alguna mutación en el loci homólogo al del cromosoma mutado para causar la pérdida de heterocigocidad y la homocigocidad resultante dará lugar a una célula con potencial suficiente para desencadenar el desarrollo del tumor.

Muchos de estos mecanismos han sido confirmados mediante el análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) usando marcadores que flanquean al gen RB1 por ejemplo; en aquellos casos en que la condición de heterocigocidad para diferentes marcadores se ha confirmado en tejidos somáticos normales, se ha visto que el tejido tumoral se encuentra en estado de homocigocidad indicando la pérdida del alelo normal (Weatherall, 1991).

II. GENETICA MOLECULAR DEL GEN RB-1

El gen RB-1 se localiza en la banda 14 del brazo largo del cromosoma 13 (13q14), presenta una longitud de 200 kb (Figura 2) y se encuentra formado por 27 exones, con diferentes tamaños, de 31 pb hasta 1889 pb, este gen se transcribe en un mRNA de 4.7 kb y codifica para una fosfoproteína de 928 aminoácidos y 110 KD (Dunn, et al, 1988; McGee, et al, 1989; Mitchell, et al, 1988) cuya función es regular de manera negativa el proceso de división celular, cualquier mutación que se presente en uno solo de los 27 exones incluyendo la región promotora del gen puede suprimir la función reguladora del gen y conducir al desarrollo del tumor (Figura 3).

III. FOSFOPROTEINA pRB110

Esta proteína está formada por 3 dominios (A, B y C), los dominios A y B se encuentran conservados entre diferentes proteínas involucradas en el ciclo celular mientras que C no participa en la regulación del ciclo celular. El dominio A y B no presentan capacidad para inhibir el ciclo de manera independiente, se requiere la expresión de ambos para inhibirla (Kevin, et al, 1996) (**Figura 4**). Ensayos de transfección han revelado que un dominio puede orientar al otro hacia la región promotora para formar la unidad represora A-B que inhibe la transcripción a través de su interacción con el factor E2F, además la unidad represora A-B de pRB110 también es capaz de unirse a oncoproteínas de tipo viral como E1A de adenovirus (Kevin, et al, 1996).

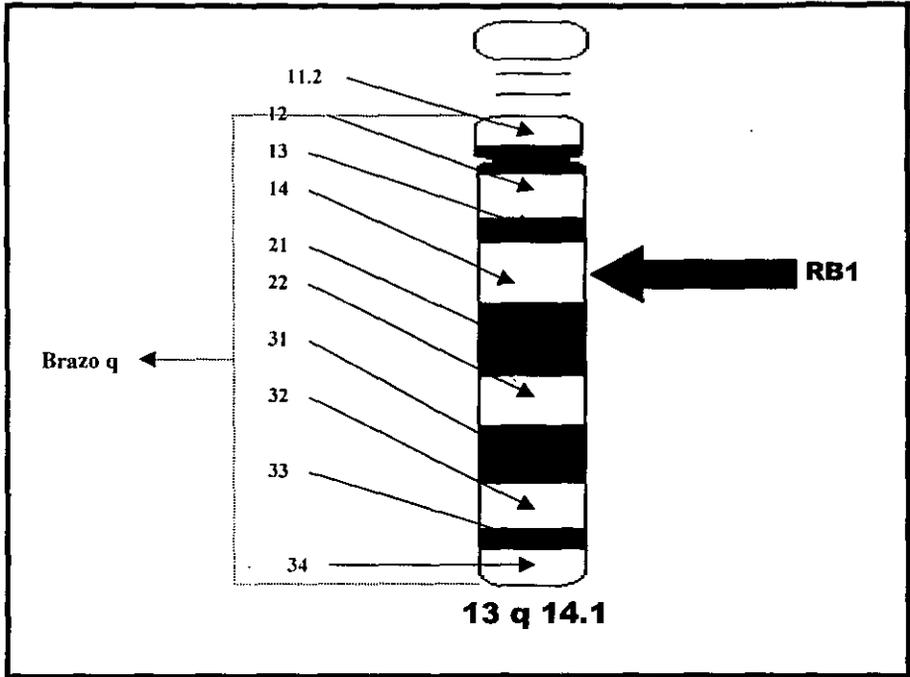


Figura 2.- Esquema del cromosoma 13 con la técnica de tinción de las bandas G.

La flecha indica el locus del gen RB1 en la región cromosómica 13q14.1 (Díaz y Orozco; 1992)

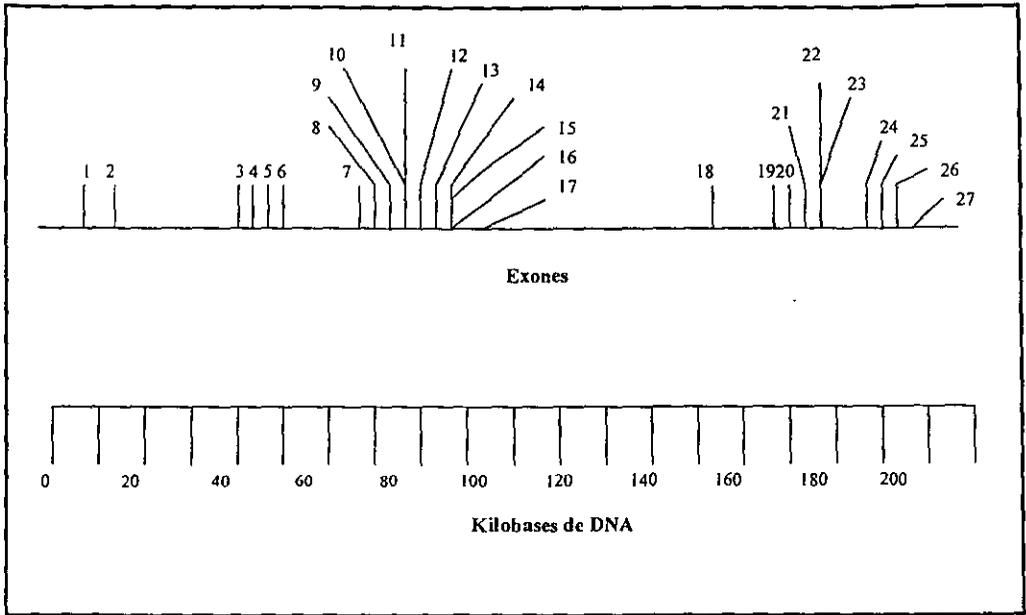


Figura 3.- Mapa del gen de retinoblastoma humano.

Los 27 exones que conforman el gen del retinoblastoma codifican para un mRNA de 4.7 Kb. (Yandell, Dryja, 1989)

IV. LA pRB110 EN EL CICLO CELULAR

El gen RB-1 regula el ciclo celular de manera negativa, a través de la proteína la pRB110, la cual se une al factor E2F inhibiendo la expresión de algunos proto-oncogenes que en condiciones normales promueven la división celular. La función reguladora de la proteína pRB110 está regulada por de proteínas dependientes de cinasas (proteincinasas) (Shirodkar, et al, 1992).

Durante la fase M la proteína pRB110 se encuentra activa (no presenta fosforilación) de esta manera forma complejos inactivos con el factor E2F deteniendo la expresión de aquellos genes que promueven la división celular.

En la fase G0 y G1, la pRB110 actúa con cinasas que dependen de ciclinas (cdk), provocando la inactivación (forma fosforilada o hipofosforilada), en este evento el factor E2F y las proteínas se liberan para dar paso a la siguiente fase.

Al final de la fase S, la pRB110 interactúa con cinasas dependientes de ciclinas y sufre una hiperfosforilación liberando al factor E2F permitiendo así la expresión de genes cuyos productos promueven la división celular, de allí que cualquier fenómeno que altere la correcta función de la proteína pRB110 puede dar lugar al desarrollo de tejido neoplásico en las células retinoblastoides, finalmente estos aspectos son los que han permitido considerar al gen RB-1 como un gen supresor del ciclo celular. (Hollingsworth, et al, 1993, Weinberg, 1995) (Figura 5)

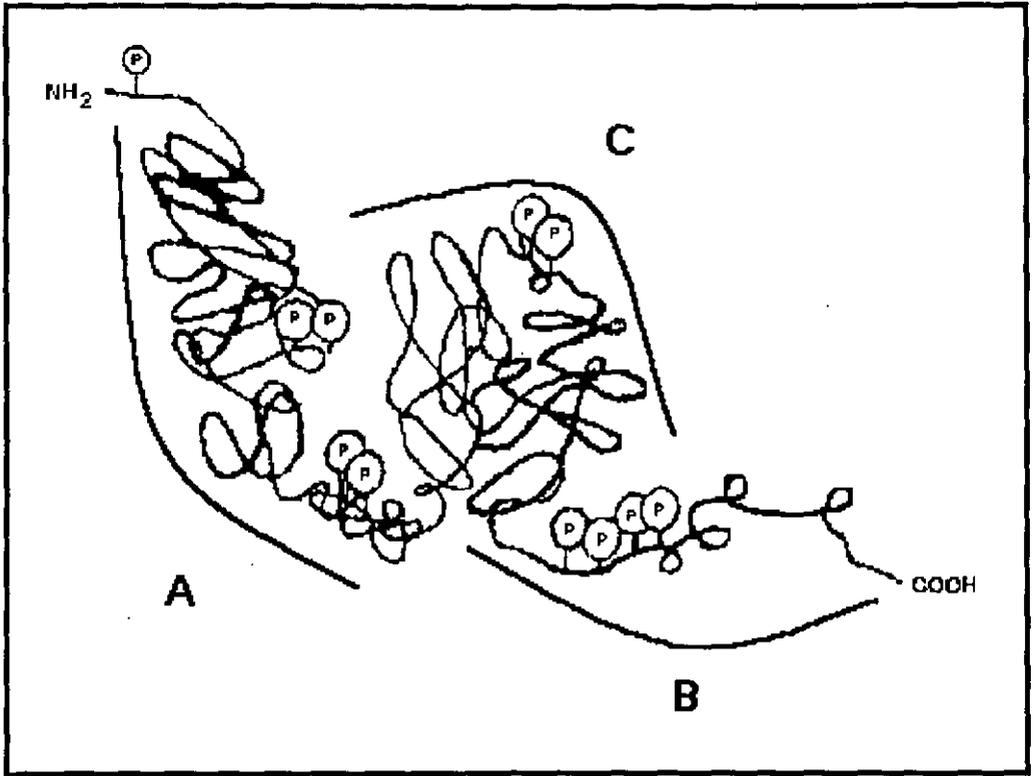


Figura 4.- Estructura de la proteína pRB110.

Se observan los dos dominios que son funcionales (A y B), así como los posibles sitios de fosforilación en los aminoácidos. Aun no se conoce la función exacta del dominio C pero existen evidencias de una posible función como chaperonina. (Hollingsworth, 1993)

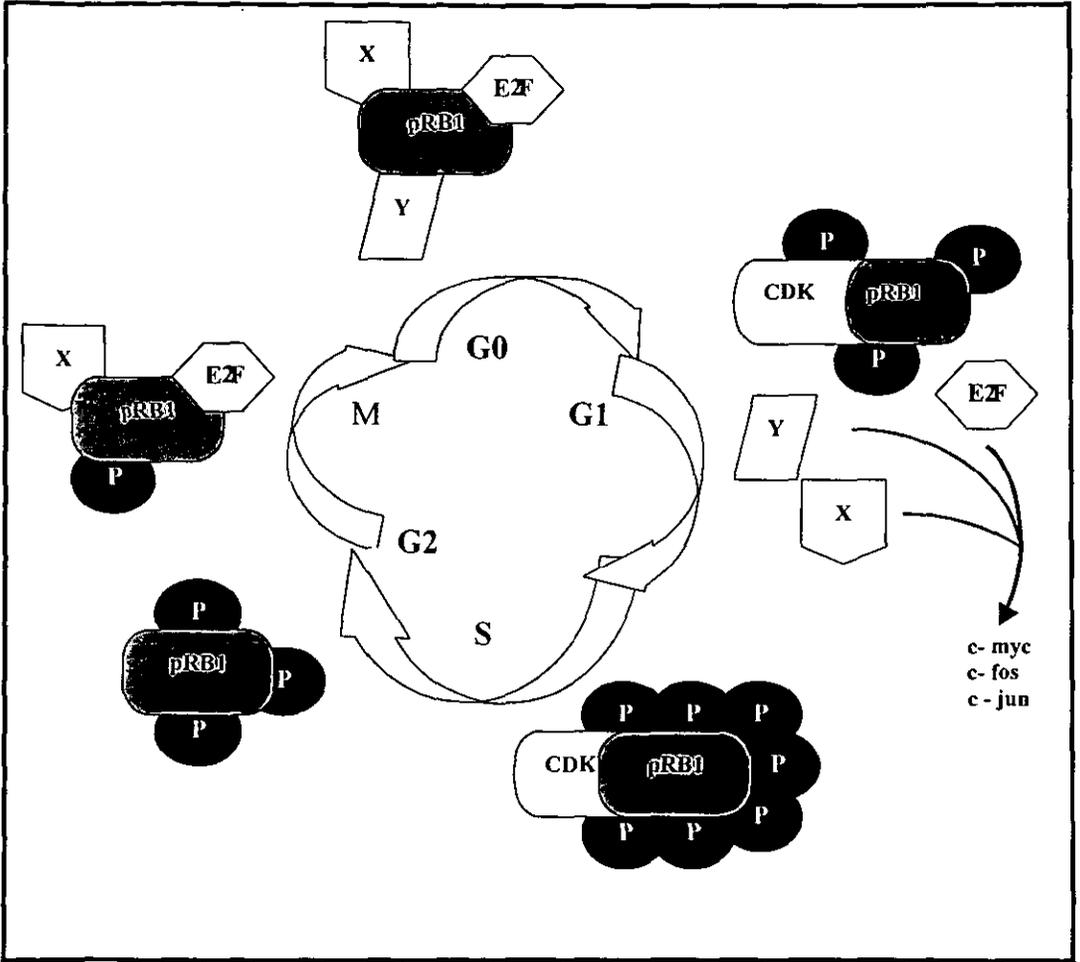


Figura 5.- LA PROTEINA pRB110 EN EL CICLO CELULAR.

La unión de la pRB110 al factor E2F se encuentra regulada durante el ciclo celular por procesos de fosforilación y desfosforilación de manera alternada. La forma desfosforilada se une a E2F mientras que la forma fosforilada no puede hacerlo. (Hollingsworth, 1993).

V. FUNCIÓN DEL PROMOTOR EN LA EXPRESIÓN DEL GEN RB1

Para que pueda iniciarse la transcripción se requiere que la RNA polimerasa se adhiera a una región específica del DNA llamada promotor, el promotor circunda los primeros pares de bases denominadas punto de inicio que es donde empieza la transcripción del RNA, cualquier mutación en esta región puede por lo tanto suprimir la síntesis de la proteína. La región del promotor es rica en bases G•C, lo que le da especificidad a la región promotora para que la RNA polimerasa se adhiera (Lewin, 1997).

En la región promotora de este gen se presentan las islas CpG; también se ha visto experimentalmente que las islas CpG en la región promotora del DNA de mamíferos presentan una inherente resistencia a ser metiladas (Caron de Fromentel, et al, 1992), en la región promotora la metilación que se presenta en estas islas, está estrechamente relacionada con la no expresión del gen y a su vez la desmetilación es necesaria para la expresión del gen RB-1. (Lewin, 1997).

La secuencia del promotor se encuentra altamente conservada, esto incluye las regiones donde se adhieren los elementos que participan en el control transcripcional (por ejemplo E2F), de esta manera si se presenta un sólo cambio en la secuencia de la región promotora (TTTCCCGC) los niveles basales de transcripción son disminuidos, provocando una baja expresión de la proteína pRB110 perdiendo su función inhibidora, lo cual activa el desarrollo del tumor en

los retinoblastos, incluso esos niveles bajos de transcripción originarían la activación de varios oncogenes como c-myc, originado otro tipo de tumores. (Zacksenhaus, 1993, Cowell, 1991, 1996).

Por lo antes expuesto es imprescindible analizar con detalle los aspectos moleculares relacionados a la región promotora para tener un conocimiento detallado de los procesos que a nivel molecular regulan la actividad supresora del gen RB-1 lo cual al final permitirá establecer metodologías encaminadas a un mejor manejo preventivo y correctivo del gen defectuoso en los pacientes afectados e individuos con alto riesgo de desarrollar la enfermedad esto representaría por otro lado un avance muy significativo para pasar al siguiente nivel de la medicina molecular como lo es la terapia génica.

VI. MUTACIONES EN EL GEN RB-1

A diferencia de otras entidades genéticas en el gen RB-1 las mutaciones pueden ocurrir en cualquier parte del gen ya que no existen sitios de mayor predisposición a presentar mutaciones que puedan bloquear la función del gen como regulador negativo del ciclo celular, no obstante las mutaciones que más se presentan son mutaciones puntuales. En el gen se presentan islas CpG, en experimentos realizados por Caron de Fromental, et al, (1992) se ha observado un fuerte bloqueo de las islas CpG en las secuencias codificantes. Así mismo se ha visto que las islas CpG en la región promotora del DNA de mamíferos presentan una inherente resistencia a ser metiladas.

En la región promotora, la metilación de estas islas está relacionada con la no expresión del gen y a su vez, la desmetilación es necesaria para la expresión del gen RB-1 (Lewin, 1997). Es importante aclarar que el proceso de desaminación espontánea ocurre con alta frecuencia en cadenas unicasenarias especialmente durante el proceso de transcripción en la cadena que no se transcribe, la cual, es reparada menos eficientemente que su cadena complementaria.

Además, la hipermetilación de las islas CpG en el gen RB-1 podrían ser un evento mutacional significativo causante del retinoblastoma unilateral no hereditario pues se le ha observado en 9 de 69 (13%) tumores unilaterales y en ninguno de 57 tumores bilaterales (Greger, et al, 1994).

JUSTIFICACIÓN

La región promotora es muy importante para que se adhiera la RNA polimerasa al DNA y se inicie la transcripción, permitiendo la expresión del gen RB-1 y por ende de su producto la proteína pBR110; al presentarse cambios en la secuencia del promotor puede suprimirse la función reguladora del gen y conducir al desarrollo del tumor.

ANTECEDENTES

- En la actualidad el Instituto Nacional de Pediatría (INP) recibe aproximadamente 50 casos nuevos con retinoblastoma y la mayoría requiere de la enucleación de un ojo por falta de un diagnóstico temprano.
- El diagnóstico temprano del tumor del retinoblastoma evita su diseminación a través del nervio óptico.
- El análisis de los 27 exones en pacientes afectados con retinoblastoma y que han resultado no informativos hace suponer que existen regiones del gen que no se han analizado detalladamente.
- En la actualidad se tienen 50 casos de pacientes que no presentan mutaciones en los 27 exones analizados.

HIPÓTESIS

Si existen mutaciones asociadas a la región promotora en gen RB-1, entonces éstas inhiben la función del gen provocando el desarrollo del tumor.

OBJETIVO

Analizar la región promotora del gen RB-1 utilizando técnicas moleculares que permitan detectar mutaciones en pacientes afectados con retinoblastoma.

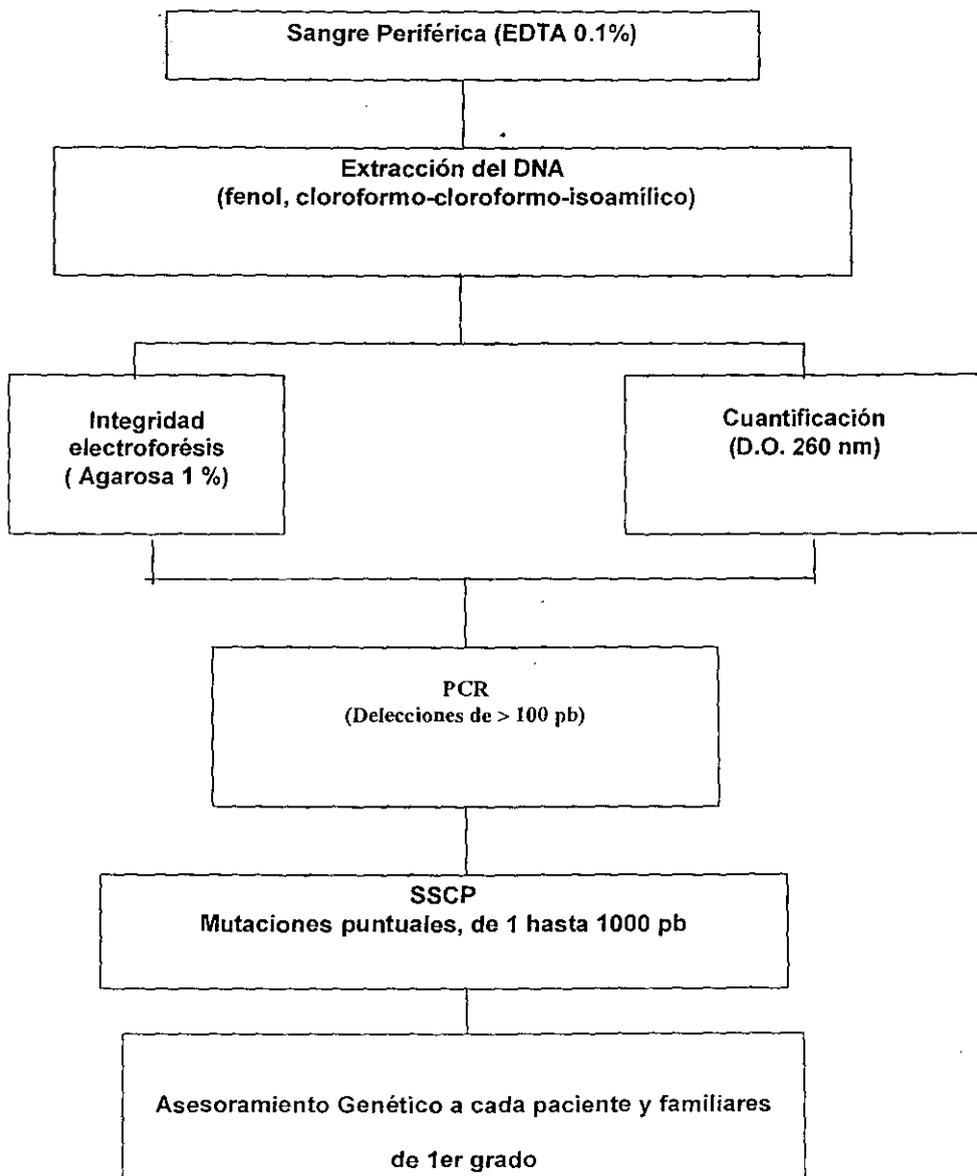
OBJETIVOS PARTICULARES

- Detectar mediante PCR y análisis de SSCP mutaciones asociadas al desarrollo del retinoblastoma.
- Aportar información suficiente para proporcionar a los pacientes un diagnóstico acertado y un asesoramiento genético adecuado.
- Establecer las herramientas moleculares que permitan diagnosticar la enfermedad en individuos con alto riesgo, aún antes de que se manifieste la enfermedad.

VII. ESTRATEGIA GENERAL

Se analizó una población de 50 pacientes diagnosticados histopatológicamente con retinoblastoma. El estudio se realizó tomando una muestra de sangre periférica de 7-14 ml de cada paciente de donde se extrajo el DNA por métodos convencionales (Slater, 1986) y se realizó un tamiz por PCR clásico para amplificar la región promotora, el siguiente paso fue analizar los polimorfismos conformacionales de cadena sencilla en cada una de las muestra en busca de mutaciones que puedan estar asociadas al desarrollo del tumor, los amplificados se analizaron a través de geles de agarosa y de acrilamida no desnaturizante.

DIAGRAMA DE FLUJO



VIII. METODOLOGÍA

1.- Obtención de DNA.

Se tomaron 7 ml de sangre periférica con EDTA como anticoagulante, se centrifugaron 20 minutos a 3000 rpm, el plasma y los eritrocitos se desecharon y a los linfocitos se les agregó 3 ml de RCBL, se agitaron y centrifugaron 10 minutos a 3000 rpm, posteriormente se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 3 ml de RCBL, se volvieron a centrifugar 10 minutos a 3000 rpm, y así sucesivamente hasta eliminar toda la hemoglobina. El botón con los linfocitos se resuspendió en 333 μ l de WCBL y posteriormente se procedió a incubar 12 horas a 42°C para hidrolizar los linfocitos.

2.- Purificación de DNA.

Utilizando el hidrolizado se procedió a agregar 2 ml de fenol saturado, se agitó 10 minutos y se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm, se obtuvieron 2 fases, la superior se recuperó en un tubo cuidando de no tocar la interfase y este paso se repitió una vez más. A la fase superior se le agregó 1 ml de cloroformo y 1 ml de fenol saturado, se agitó y se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm, se volvió a pasar la fase superior a un tubo sin tocar nuevamente la interfase y se repitió el paso anterior nuevamente, al final se agregaron 2 ml de cloroformo/isoamílico (24:1), se agitó y se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm; la fase superior obtenida se pasó a un tubo y se le agregaron 90 μ l de NaCl 1 M y 3 ml de etanol absoluto a -20°C. Se

agitó hasta que el DNA precipitó y se procedió a extraerlo con una pipeta Pasteur, se selló y se dejó secar a temperatura ambiente, posteriormente se enjuagó con etanol a -20°C, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 200 µl de agua destilada estéril.

3.- Cuantificación de DNA

Para realizar la cuantificación se diluyó 1 µl de DNA en 250 µl de agua destilada (1:250), y se procedió a la lectura de la densidad óptica con una longitud de onda (λ) de 260 nm, posteriormente se procedió a aplicar la siguiente fórmula:

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

donde :

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

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

dil = volumen de dilución equivalente a 250 µl

4.- Integridad de DNA.

Para comprobar la integridad del DNA se realizó una electroforesis, para ello, se utilizó 1 µl de muestra, 2 µl de azul de bromofenol-xilencianol y 5 µl de agua estéril, posteriormente se corrió el ensayo en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio por 20 minutos empleando 100 volts.

5.- Síntesis de Oligonucleótidos.

Para realizar la reacción en cadena de la polimerasa se sintetizaron los oligonucleótidos de acuerdo con las secuencias diseñadas por Blanquet y col. (1994). Hay que recordar que la síntesis es un acoplamiento de monómeros (A,T,G,C) para la obtención de un multímero de longitud y unas secuencias determinadas. Cada síntesis requirió de una serie de ciclos, en cada uno de los cuales se les fue agregando un nucleótido a la cadena en crecimiento. Los oligonucleótidos diseñados para la región promotora se muestran en la tabla 2.

TABLA 2 OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAR LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN RB		
Región	Secuencia de oligonucleótidos	Amplificado
Promotor	R 5'CTGGACCCACGCCACGTTTCTGTTTAA3' F 5'ATTGGTACCCGACTCCCGTTACAAAAT3'	230 pb

De acuerdo con Blanquet, et al (1994).

6.- Amplificación utilizando el PCR.

Se llevó a cabo la estandarización del PCR de la región promotora del gen RB, se utilizaron diversas pruebas para encontrar las concentraciones adecuadas en los reactivos usados, en el DNA, temperaturas y tiempos de los ciclos y el análisis de los productos se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% utilizándose bromuro de etidio, se corrió la electroforesis y se observó el DNA en un trasiluminador de luz UV.

7.- Técnica de SSCP (análisis del polimorfismo conformacional de cadena sencilla).

En la SSCP se emplearon las muestras obtenidas y se amplificaron mediante el PCR, con la diferencia que ahora se agregó a la reacción [α -³²P]dCTP y posteriormente se analizaron los amplificados radioactivos por electroforesis utilizando geles de poliacrilamida no desnaturizante.

8.- Electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturizante.

Se mezcló una muestra de 1.5 μ l de amplificado con 9 μ l de colorante xilencianol-azul de bromo fenol y se incubó 10 minutos a 95°C, con el objeto de desnaturizar el DNA, posteriormente se colocó la mezcla en hielo frappé por espacio de 5 minutos y se agregaron 3 μ l de cada muestra en un gel de

poliacrilamida de 33.5 X 39.3 cm, con un grosor de 0.3 mm, por espacio de 19 horas a 150 V utilizando un amortiguador de TBE 1 X.

9.- Autorradiografía.

Se colocó el gel en un papel filtro y se cubrió con una película de Egapack, se dejó secar a 80°C durante 1 hora, utilizando un sistema de vacío con dos placas Kodak O-matic; se revelaron en tiempos de 12 y 24 horas para poder observar la marca radioactiva que se quedó impresa en las autorradiografías.

IX. DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS

SÍNTESIS DE OLIGONUCLEÓTIDOS

La síntesis es un acoplamiento de monómeros (A,T,G,C) para la obtención de un multímero de longitud y unas secuencias determinadas, la reacción consta de cuatro pasos principales, y se desarrolla sobre un polímero inerte (soporte sólido) en el cual se ensambla el oligonucleótido mediante una adhesión sucesiva de nucleótidos libres; el primer 3' nucleósido (A, C, T o G) se ancla a este soporte mediante un puente de succinato, el proceso se inicia lavando el soporte sólido que contiene el monómero inicial con dicloroetano y después se sucede en forma continua los siguientes pasos:

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

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

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

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

Acoplamiento : Reacción de condensación entre los nucleótidos.

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

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

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

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Esta técnica puede amplificar selectivamente una región del DNA en varios millones en solo unas horas, permite el análisis y detección de secuencias específicas de un gen a partir de la muestra de un paciente. El termino "**reacción en cadena de la polimerasa**" se aplica al proceso bioquímico *in vitro*, mediante el cual las cadenas individuales de DNA blanco son duplicadas por la DNA polimerasa en cada uno de los ciclos (generalmente entre 20 y 30) que integran la reacción, al final de cada uno de los cuales las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, lográndose una producción exponencial de millones de copias del gen o segmento de DNA específico sometido al proceso. (Mullis, et al, 1987; Erlich, 1989; Shimizu, et al, 1994) **(Figura 6)**

Componentes requeridos son: **A) iniciadores** (oligonucleótidos) específicos que flanquean al gen o segmento que actúa como blanco para la amplificación, **B) mezcla de desoxinucleótidos** (dNTP's), **C) solución amortiguadora de reacción**, **D) $MgCl_2$** y **E) DNA polimerasa**.

Cada uno de los ciclos de la reacción consta de tres pasos determinados por temperaturas y tiempos específicos, que son:

- 1) **Desnaturalización** (92-98 °C, de 30 a 90 segundos), en donde se separan o desnaturalizan las dos cadenas complementarias de DNA.

- 2) **Alineación** (50-60 °C, de 30 a 60 segundos), en el cual se realiza el apareamiento específico entre los iniciadores y las cadenas simples del segmento de DNA desnaturalizado.

- 3) **Extensión** (70-75 °C, 30 a 90 segundos), en donde la DNA polimerasa extiende la longitud de los iniciadores apareados al DNA, al ir polimerizando los desoxinucleótidos libres, resultando en nuevas cadenas complementarias a las dos cadenas sencillas presentes al inicio de la reacción.

El ciclo siguiente se inicia en el mismo tubo, con los mismos componentes de la mezcla de reacción, pero ahora contiene el doble de cadenas sencillas de DNA, así sucesivamente hasta completar los 30 ó 35 ciclos de replicación; al final se obtendrá una buena cantidad de DNA amplificado. (Watson, 1992)

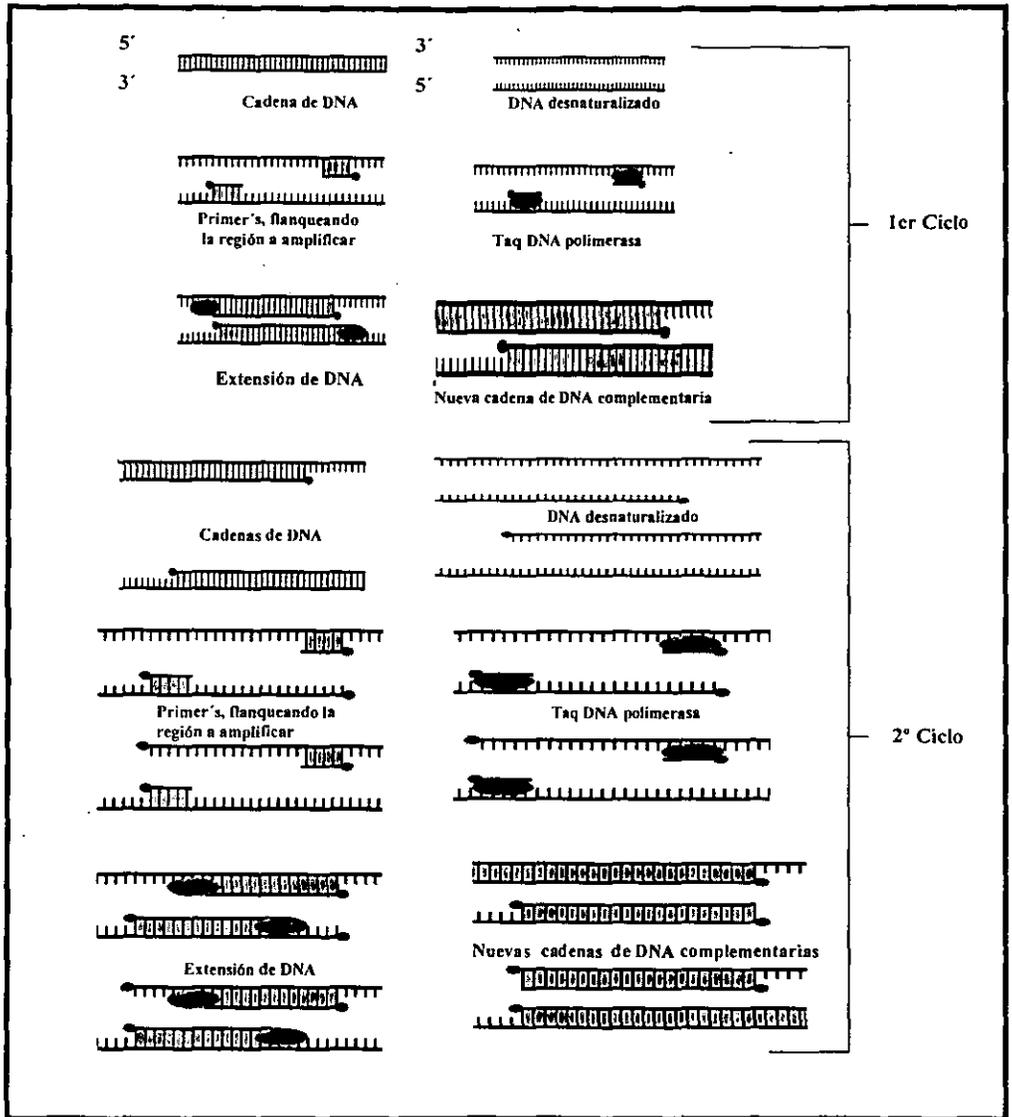


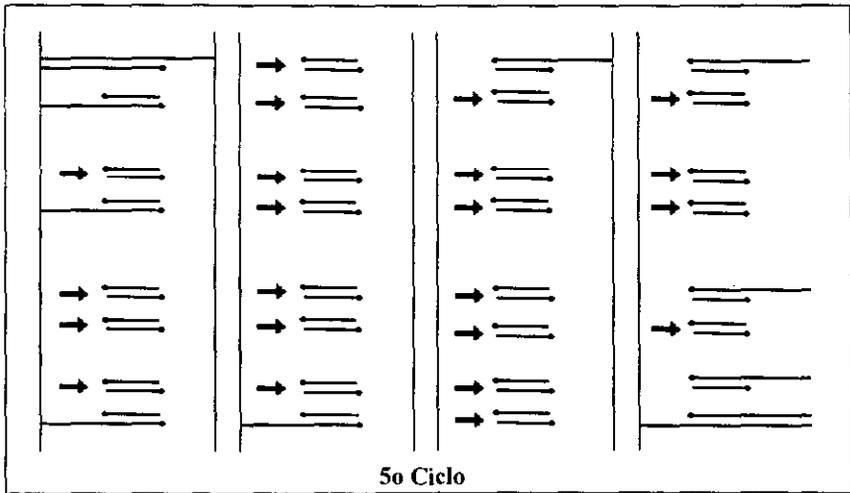
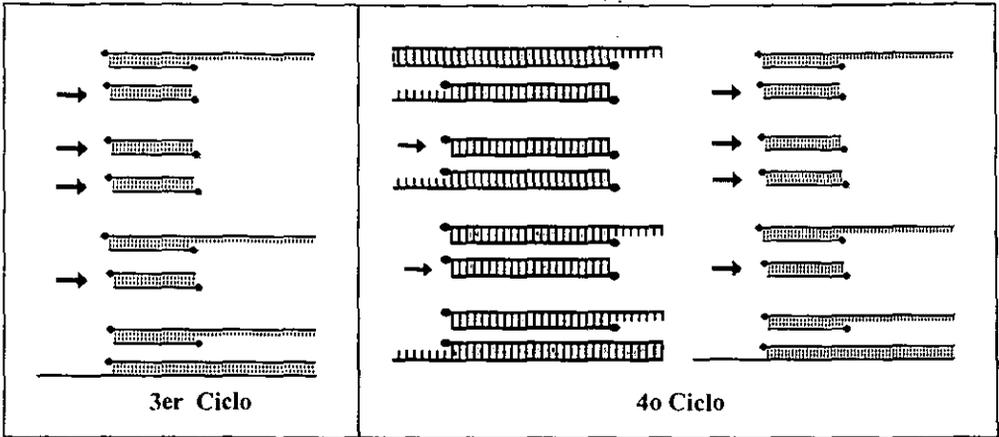
Figura 6.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Durante esta reacción se llevan a cabo 4 pasos primordiales y son: a) desnaturalización y alineación, b) polimerización y terminación

Continúa siguiente página



Fragmento de DNA amplificado



Continuación Fig. 6

c) desnaturalización y alineamiento de los oligonucleótidos y d) extensión de los oligonucleótidos, es hasta el 3er ciclo de replicación donde se comienza a sintetizar los fragmentos de DNA deseados.

ANÁLISIS DE POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE CADENA SENCILLA

(SSCP)

Es una herramienta que permite detectar alteraciones genéticas de tipo puntual cuya ubicación en el DNA se conoce y que están asociadas con una gran cantidad de enfermedades de índole genética; esta técnica permite analizar mutaciones que van de un orden de una base y hasta mil pares de bases con una eficiencia mayor al 90% la cual se incrementa si se combinan con enzimas de restricción hasta en un 100%.

Su fundamento consiste en que los fragmentos de doble cadena de DNA al desnaturalizarse adquieren una conformación que es estabilizada por interacciones intracatenarias y que está determinada por la secuencia de bases de las cadenas sencillas de manera que aquellas cadenas que son portadoras de una mutación o de un polimorfismo adquieren una conformación diferente a la de la secuencia normal y cuando son analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizante presentan una movilidad diferente (Orita, et al, 1989) (**Figura 7**).

Una parte importante en esta técnica es que dentro de un grupo de individuos sanos todos sus genes son portadores de la misma información genética y por ende de la misma secuencia de bases, de manera que al analizarlos por SSCP todos presentan el mismo patrón electroforético, no así los

individuos que son portadores de una mutación ya que presentan un patrón diferente al de los individuos sanos. (Macias, et al, 1998) Esta técnica es muy eficiente para detectar la presencia de mutaciones en cualquier parte del gen que se está analizando.

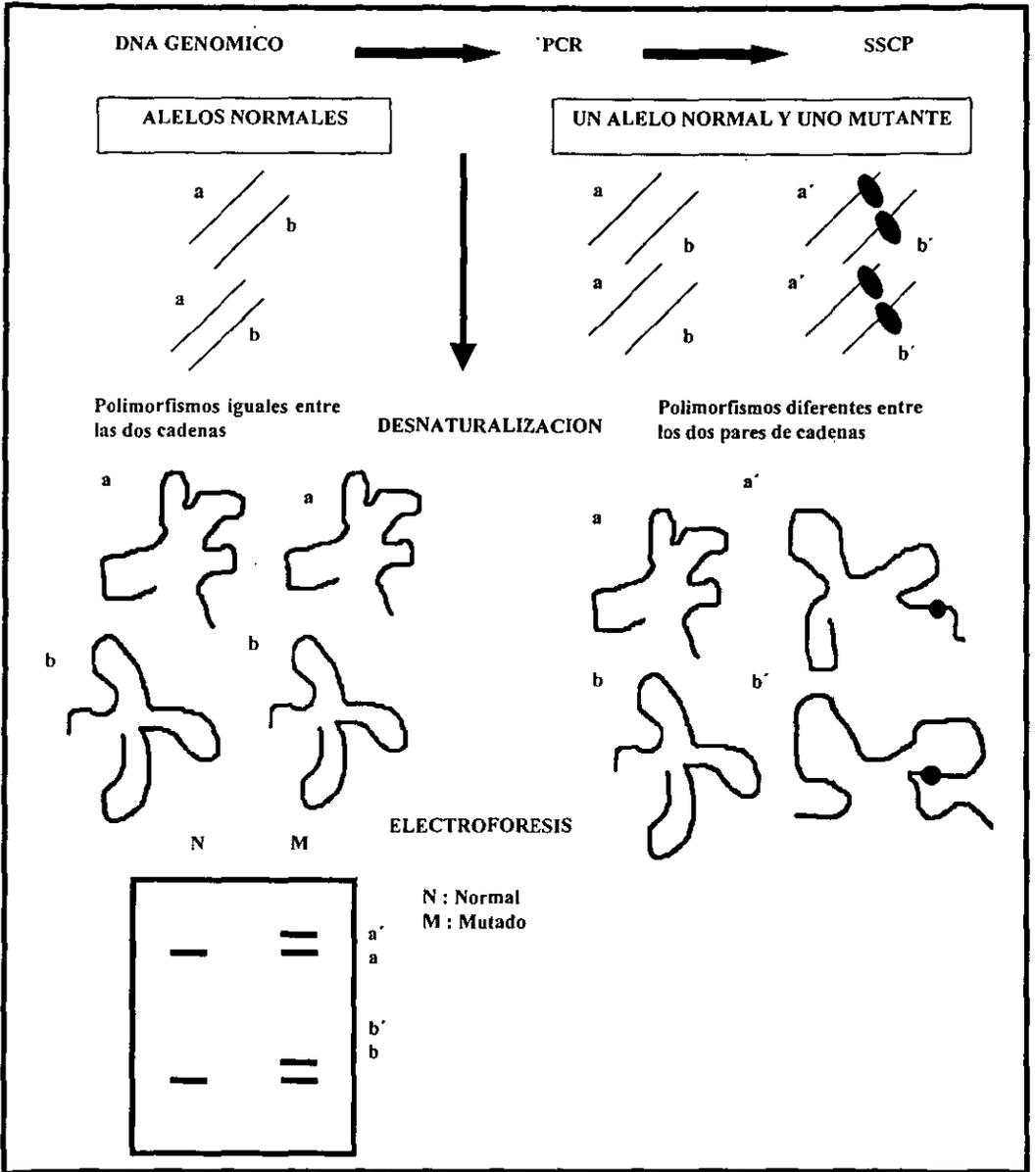


Figura 7.- Detección de polimorfismos por la técnica de SSCP.

Esta técnica se basa en la conformación que adoptan las cadenas de DNA al desnaturizarse, en la figura se muestra un ejemplo donde se comparan dos cadenas de alelos normales (a, b) contra un alelo mutante (a', b'); debido a esta mutación las cadenas mutantes migran diferente en un gel de poliacrilamida no desnaturizante. (Macias, 1998; Macias et al, 1998)

X. RESULTADOS

Hallazgos clínicos.

Se estudiaron 50 pacientes con RB diagnosticados histopatologicamente con retinoblastoma y no relacionados entre si, los cuales no presentaban mutaciones en ninguno de los 27 exones que conforman al gen del RB. De estos 50 pacientes el 58% (29) presentaron RB unilateral y 42% (21) de manera bilateral, el principal motivo de consulta fue la leucocoria con un 90 % y de estrabismo con un 10 % (Tabla 3 y 4), en todos los casos la edad de inicio del tumor fue antes de los 5 años (Tabla 5). En la mayoría de los niños el RB se presento antes del primer año de edad (Tabla 4).

TABLA 3 POBLACIÓN EN ESTUDIO CON RETINOBLASTOMA						
	RB Unilateral		RB Bilateral		TOTAL	
	29 (58 %)		21 (42%)		50	
Sexo	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
Femenino	17	34	11	22	28	56
Masculino	12	24	10	20	22	44

Población de estudio.

De los 50 pacientes analizados 29 padecen RB unilateral y 21 RB bilateral; de los 29 con RB unilateral 17 son mujeres y 12 son hombres; mientras que de los 21 casos con RB bilateral, 11 son mujeres y 10 son hombres (Tabla 3).

TABLA 4 DATOS OCULARES EN PACIENTES CON RETINOBLASTOMA			
	RB Unilateral	RB Bilateral	
Signos	No.	No.	(%)
Leucocoria	26	19	90
Estrabismo	3	2	10
Total	29	21	100

TABLA 5 EDAD INICIAL DEL PADECIMIENTO			
Edad de inicio	RB Unilateral	RB Bilateral	(%)
0 a 6 meses	6	8	28
7 a 12 meses	14	10	48
13 meses a 5 años	9	3	24
Total	29	21	100

Formación del banco de DNA.

Se creó un banco de DNA de los 50 pacientes analizados, el DNA se obtuvo a partir de sangre periférica por el método descrito en la metodología, en todos los casos la concentración del DNA fue mayor de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, y se consideró como criterio de pureza el cociente mayor a 1.6 obtenido al dividir la densidad óptica (D.O.) con una longitud de onda de 240 nm que detecta el fenol contaminante y de 280 nm que corresponde a las proteínas. En todos los casos la integridad de DNA valorada con geles de agarosa al 1 % y teñidos con bromuro de etidio presentaron un patrón óptimo de integridad observándose una sola banda de alto peso molecular, gruesa y nítida (**Figura 8**)

Amplificación por PCR.

Una vez corroborada la integridad de las muestras de DNA se procedió a la amplificación por PCR, para ello se probaron diferentes condiciones experimentales, hasta encontrar las condiciones óptimas para realizar el estudio (**Tablas 6 y 7**). Las pruebas que se realizaron para esta región fueron las esperadas ya que se observa un fragmento de 230 pb, este amplificado corresponde de acuerdo con Blanquet et al (1994) con la región promotora (**Figura 9**). El análisis de los 50 pacientes mostró que los fragmentos obtenidos por la PCR fueron del tamaño esperado (230 pb) y que no se presentaron variaciones en la migración ni tampoco bandas inespecíficas que indicaran la presencia de alguna mutación (**Figura 10**), por lo tanto se procedió a detectar las mutaciones por la técnica de SSCP.

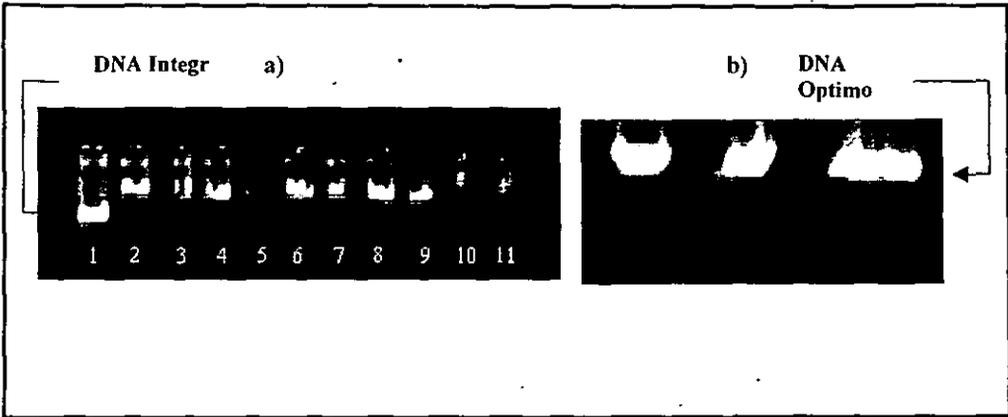


Figura 8.- Integridad del DNA de pacientes.

a) Carril 1 marcador de peso molecular Hind III, Carriles 2 al 11 DNA genómico integro el cual se encuentra concentrado en una sola banda y se localiza por arriba del fragmento de mayor tamaño del marcador de pesos. b) DNA óptimo para análisis por PCR (DNA no degradado).

TABLA 6 CONDICIONES PARA PCR	
Reactivo	Volumen
H ₂ O	13.97 µl
Amortiguador taq. 10X	2.70 µl
ATGC	0.55 µl
Oligonucleótido F	0.89 µl
Oligonucleótido R	0.89 µl
Taq Polimerasa Stoffel	1.00 µl
Mg Cl ₂	4.00 µl
DNA	100.00 ng/µl
Volumen Final	25.00 µl

TABLA 7 PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN PARA SECUENCIA GENOMICA DE RB		
Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
94 °C a)	2 Min	1
4 °C a)	40 Seg	
52 °C b)	1 Min	35
72 °C c)	1 Min	
94 °C a)	12 Seg	
60 °C b)	20 Seg	1
72 °C c)	7 Min	
4 °C d)	Enfriamiento	
a) Etapa de desnaturalización. b) Etapa de alineación. c) Etapa de polimerización. d) Etapa de terminación.		

Equipo (ver anexo II)

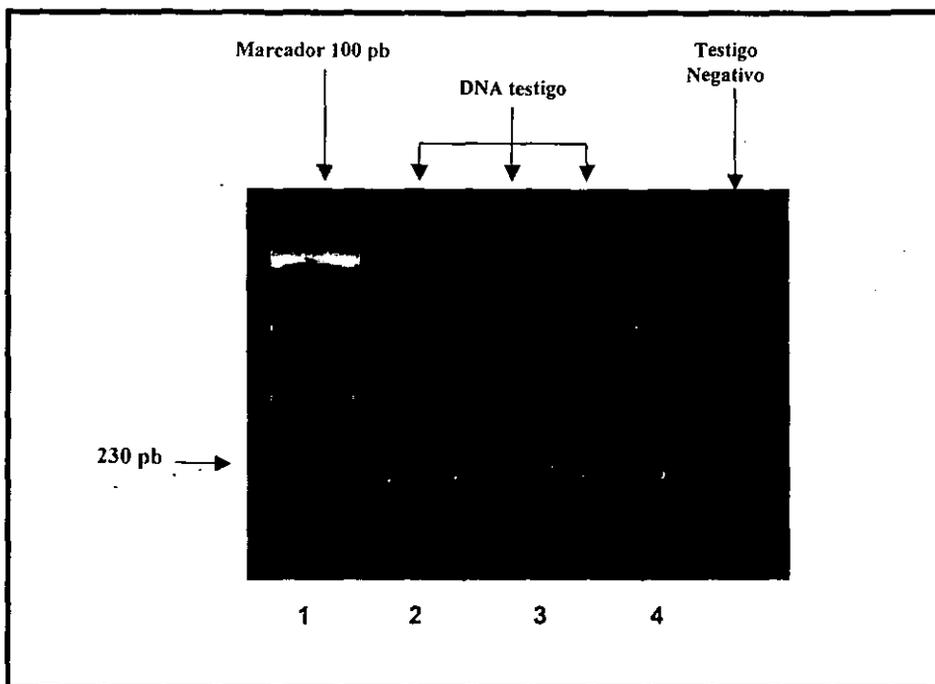


Figura 9.- Pruebas de amplificación para el promotor.

En el carril 1 se muestra el marcador de 100 pares de bases, del 2 al 4 so muestras de DNA de pacientes amplificado por PCR, el tamaño del amplificado es el esperado para el promotor; el 5 es un control negativo que contiene todo lo necesario para el PCR excepto DNA. El fragmento de 100 pb en el marcador generalmente no se observa o se ve muy tenue.

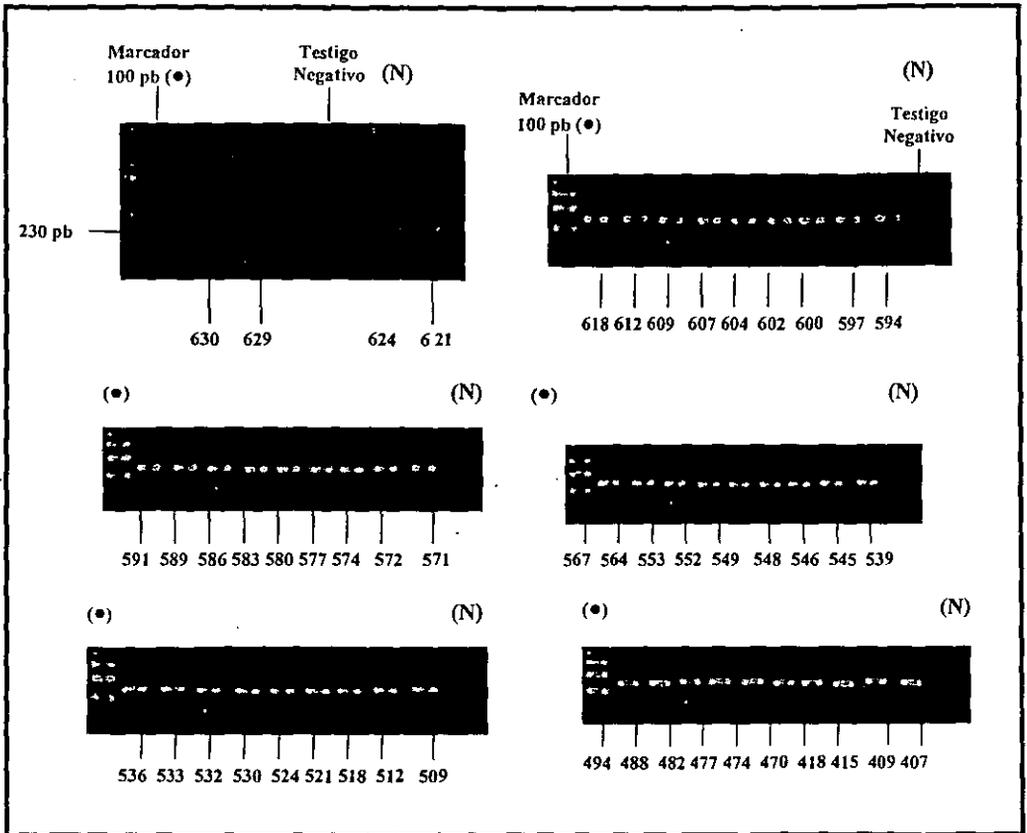


Figura 10.- Amplificación del promotor de las muestras de pacientes con RB.

Se muestran los amplificadores de los 50 pacientes con RB, en cada uno de ellos se presenta el marcador de peso molecular (●), el número de muestra del paciente con su respectivo amplificado de 230 pb del promotor y un testigo negativo (N).

Condiciones para SSCP

Una vez amplificadas las muestras DNA se procedió a la detección de mutaciones utilizando la técnica de SSCP, se probaron diferentes condiciones experimentales hasta encontrar las condiciones optimas para realizar el estudio; para ello se emplearon las mismas condiciones que un PCR normal, sólo que para este análisis se incorpora un marcador radiactivo [α -³²]PdCTP (Tabla 8), el programa de amplificación es similar sólo que al final de cada reacción se incorpora una temperatura de desnaturalización para separar las cadenas y correrlo en un gel de acrilamida no desnaturalizante (Tabla 9); el resultado de los 50 pacientes con RB muestran un patrón electroforético normal y no presentan diferencias significativas con el DNA testigo (Figura 11).

TABLA 8 CONDICIONES PARA SSCP	
Reactivo	Volumen
H ₂ O	4.00 µl
Amortiguador taq.	1.00 µl
ATGC	0.40 µl
Oligonucleótido F	0.50 µl
Oligonucleótido R	0.50 µl
Taq Polimerasa Stoffel	1.00 µl
[α- ³²]PdCTP	0.10 µl
Mg Cl ₂	1.50 µl
DNA amplificado	1.00 µl
Volumen Final	10.00 µl

TABLA 9 PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN PARA SSCP		
Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
94 °C a)	2 Min	1
4 °C a)	40 Seg	
52 °C b)	1 Min	35
72 °C c)	1 Min	
94 °C a)	12 Seg	
60 °C b)	20 Seg	1
72 °C c)	7 Min	
4 °C d)	Enfriamiento	
94 °C e)	10 Min.	1

- a) Etapa de desnaturalización.
- b) Etapa de alineación.
- c) Etapa de polimerización.
- d) Etapa de terminación.
- e) Etapa de desnaturalización.

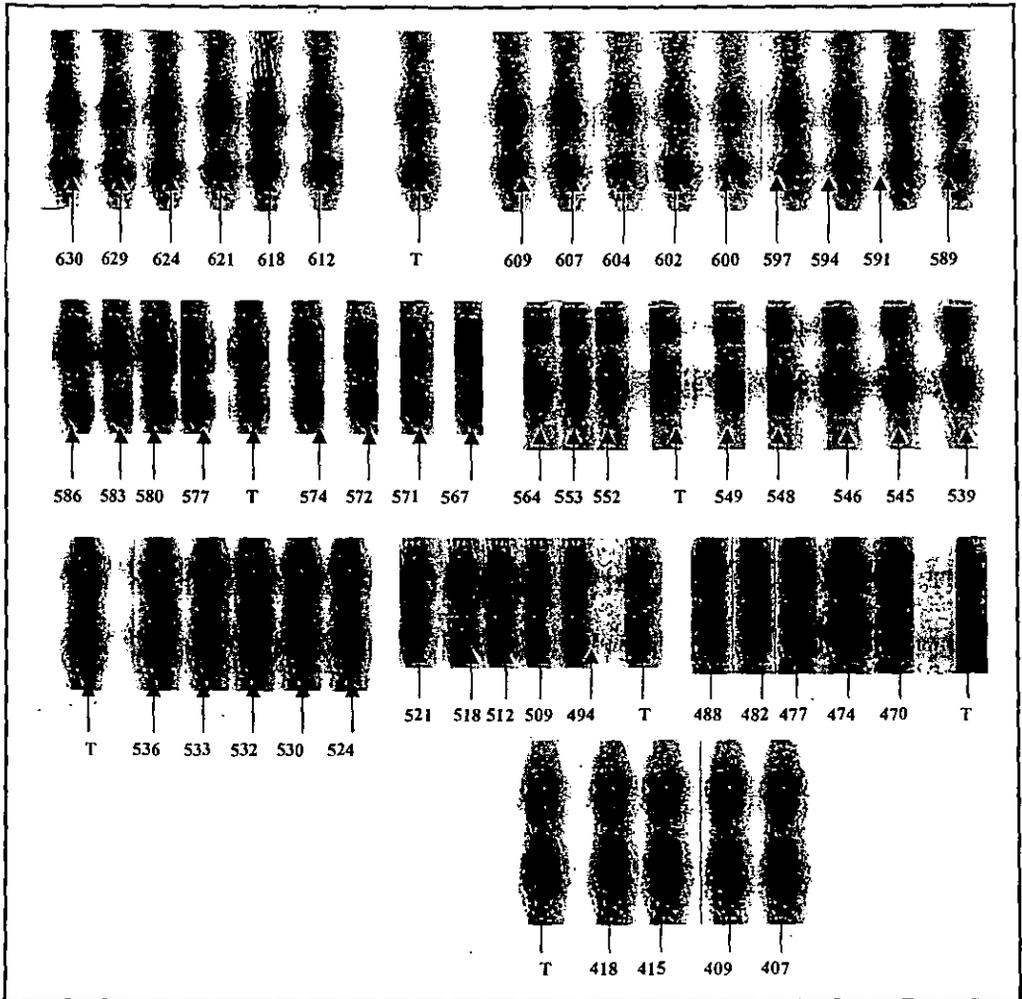


Figura 11.- Patrón de SSCP para el promotor de RB.

Se muestran los resultados y números de muestra de los 50 pacientes afectados con RB, en el último carril se observa un testigo de DNA de un individuo normal (T).

Para mostrar la manera en que se observarían las mutaciones en el promotor se muestra a continuación un SSCP del exon 4 del gen RB-1, en donde se presentan diversas mutaciones en un grupo de pacientes no relacionados entre sí.

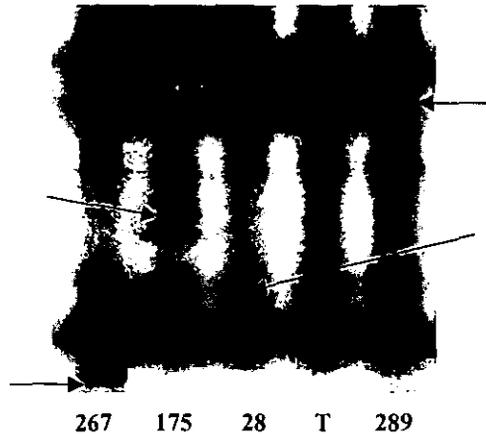


Figura 12.- Pacientes con distintas alteraciones en el patrón electroforético del exón 4 de RB.

Las flechas señalan dos bandas extra que se encontraron en el paciente 175 y una banda extra en las muestras 267 y 28; en la muestra 289 se observa una clara diferencia en la intensidad de la señal radioactiva de una de las bandas. (Cortesía de Macías V. M.)

XI. DISCUSIÓN

La población en estudio se comporta de acuerdo a lo reportado en la literatura en cuanto a la proporción de casos (RB no hereditario 60% y RB hereditario 40%), ya que el RB no hereditario se presenta en un 58% y el hereditario en un 42 %. En cuanto a la edad de inicio del padecimiento del RB, se ha descrito que el bilateral se manifiesta antes del primer año de edad mientras que el unilateral se evidencia después del primer año, en contraste con lo anterior, en la población estudiada se encontraron 20 casos (68.9%) con RB unilateral y 18 (85.7%) con RB bilateral los cuales mostraron el tumor antes del primer año de edad. En los pacientes estudiados el 90 % de los casos presentaron leucocoria como principal síntoma de diagnóstico del tumor y según lo reportado por Díaz, et al, (1992) este es la principal manifestación del retinoblastoma, seguida del estrabismo que en este estudio fue de un 10%. De acuerdo con la tabla 3 no existe una mayor predisposición al retinoblastoma en algún sexo, lo cual se ha documentado en la literatura para otras poblaciones. (Linn, 1994)

Los 50 pacientes de este trabajo tienen la característica de no presentar ninguna mutación en los 27 exones, pero desarrollaron el tumor, por lo que se sospechó que las mutaciones se presentaran en la región promotora de este gen, al realizar el análisis por SSCP para la detección de mutaciones, se encontró que ninguno de los 50 pacientes se detectó mutaciones en la región promotora, esto es muy interesante ya que generalmente la presencia de mutaciones en los

exones o el promotor son la causa del desarrollo del RB. Esto permite suponer entonces, que hay otro tipo de factores que permiten el crecimiento del tumor debido a la nula o baja expresión de la proteína pRB110; hay evidencias experimentales que permiten afirmar que estos factores son : a) la metilación en las islas CpG de la región promotora, b) la presencia de proteínas que interfieren con la fosforilación y desfosforilación de la proteína pRB110 durante el ciclo celular y c) moléculas que inhiben la actividad del factor de transcripción E2F.

a) Metilación de las islas CpG en la región promotora.

La idea de que la baja expresión de la proteína pRB110 en tumores malignos es ocasionado por metilaciones se ha observado en diferentes tipos de tumores como carcinomas de vejiga, pulmón, cerebro, prostático y tumores pituitarios, así como más recientemente en tumores de RB hereditarios y no hereditarios (Simpson et al, 2000). La presencia de las islas CpG de la región promotora son lugares en los cuales se puede producir la metilación y con ello predisponer el desarrollo del tumor, Greger (1994) encontró que la metilación en el gen de RB ocurre en un 13% en tumores unilaterales y que la actividad del gen sufre una reducción, Ohtani-Fujita, et al, (1993) en experimentos *in vitro* demostraron que la metilación de las islas CpG en el promotor reduce considerablemente la actividad del gen y por ende la expresión de la proteína pRB110; esto coincide con los resultados de Zacksenhaus et al, (1993) en los cuales la región promotora del gen RB en ratones se encuentra metilada, favoreciendo con esto el desarrollo del tumor, es importante recordar que la secuencia de la región promotora del gen RB

del ratón y del humano presentan una similitud del 90%, lo cual podría favorecer la hipótesis de la metilación como causa del RB.

Con base en los resultados obtenidos puede haber 2 posibles mecanismos por medio de los cuales los grupos metilos favorecen el desarrollo del tumor y estos son:

a) La presencia de los grupos metilo en el promotor del gen pueden impedir que se adhieran correctamente los elementos que reconoce en la región promotora la DNA polimerasa, ocasionando una transcripción errónea y conllevando a una disminución en la síntesis de la proteína pRB110, esto produciría una disminución en la actividad inhibidora de la proteína provocando el desarrollo del tumor.

b) Los grupos metilo pueden adherirse a la proteína pRB110 en los sitios donde se une el factor de transcripción E2F, dejando a la proteína pRB110 en su forma fosforilada e inactivada provocando una alteración en el ciclo celular, esto ocasionaría la expresión de los posibles oncogenes como *c-jun*, *c-fos* y *c-myc* permitiendo el desarrollo del tumor (**Figura 12**); esta última posibilidad se basa en evidencias experimentales *in vitro* (Di flore et al, 1999).

La idea de que la presencia de los grupos metilo en la región promotora del gen RB puedan favorecer el desarrollo del tumor, apoya el planteamiento de que la metilación es un mecanismo potencial de inactivación del gen RB. Las islas

CpG normalmente se encuentran desmetiladas y pueden ser metiladas, esta es una evidencia que la metilación en el DNA es un proceso de control epigenético en la expresión del gen.

b) La presencia de proteínas que interfieren en el proceso de fosforilación y desfosforilación de la proteína pRB110 durante el ciclo celular.

CDKN2 es un gen que codifica para 2 proteínas: p16 y p14, la primera está formada por 156 aminoácidos y su función es la de inhibir ciclinas dependientes de kinasas (CDKs) y estas CDKs median la fosforilación y desfosforilación en la proteína pRB110 del retinoblastoma, que es un paso crítico en la progresión del ciclo, además la fosforilación es estimulada por la cíclica D1 e inhibida por p16 (Xuqiu et al, 1998).

Se puede presentar una desregulación en la fosforilación de la proteína pRB110, debido a una sobre expresión de la cíclica D1 y una baja funcionalidad de p16 resultando un descontrol en el ciclo celular. Gorgoulis et al (1998), encontraron que una desfuncionalidad en el producto de CDKN2/p16 se presenta en un alto porcentaje en líneas celulares de carcinomas, lo que sugiere que esta proteína es un candidato como supresores de tumores. Una situación similar se describe en el gen RB para el desarrollo del tumor, además estas anomalías se han reportado en un amplio espectro de tumores como el pancreático, pulmón, y cerebro (Xuqiu et al, 1998).

Si las CDKs son en parte las responsables de la fosforilación y desfosforilación de la pRB110 y estas a su vez son inhibidas por la presencia de p16, esto provocaría que la expresión de p16 inhiba la desfosforilación de la proteína pRB110, provocando que se sobre expresen los posibles oncogenes como *c-jun*, *c-fos* y *c-myc* causando el posible desarrollo del tumor; además la sola presencia de p16 en el promotor también evita que los factores de transcripción (E2F) se adhieran a la proteína pRB110 produciendo una alteración en el ciclo; lo anterior apoya la idea que la presencia de p16 puede inducir el desarrollo del tumor, independientemente de las mutaciones que se presenten en el gen RB-1.

c) Moléculas que inhiben la actividad del factor de transcripción E2F.

La esfingosina, es un esfingolípido que ejerce múltiples actividades biológicas donde presenta efectos inhibidores en: las células hematopoyéticas de crecimiento, agregado plaquetario humano, coagulación de la sangre, en la activación neutrofílica, diferenciación celular y más recientemente se ha observado que tiene participación en la desfosforilación del gen RB (Chao et al, 1992). Se pueden presentar moléculas que participan en la desfosforilación tal es el caso de la *D-erythro*-esfingosina, que es un potente inductor de desfosforilación, ya que esta molécula va a inhibir la unión del factor de transcripción E2F con la proteína pRB110 (Hamel et al, 1992).

Experimentos con diferentes líneas celulares muestran que la esfingosina induce la desfosforilación del RB, esto es provocado por una baja unión del E2F con secuencias específicas del DNA, además la esfingosina causa una disminución en el RNAm del oncogen *myc-c* que depende de la unión de E2F con sitios específicos de la proteína (Dbaibo et al, 1995). Estas evidencias muestran que el RB puede depender de vías de regulación celular las cuales posiblemente activan a la esfingosina.

Los resultados obtenidos en los pacientes que no presentan mutaciones en la región promotora y los 27 exones, permiten pensar que además de la mutación existen vías o mecanismos involucrados en el desarrollo del tumor, los cuales funcionan de manera independiente unos de otros o en algunos casos podrían participar en conjunto, por lo que deben ser investigados más a fondo para entender de que manera participan en el desarrollo del tumor.

En la actualidad solo se ha reportado una sola mutación en la región promotora, en un estudio realizado por Cowell, et al, (1996) donde se encontró un cambio en un aminoácido, el de G por C, en este estudio se analizaron los miembros de una familia en 5 generaciones (10 individuos), de estos 3 presentan el tumor de manera unilateral.

En la actualidad se siguen estudiando a los 50 pacientes afectados con RB en el National Cancer Inst. Frederick Cancer Res. Dev. Fac. Meryland, USA., a cargo de la Dra. Lorena Orozco Orozco.

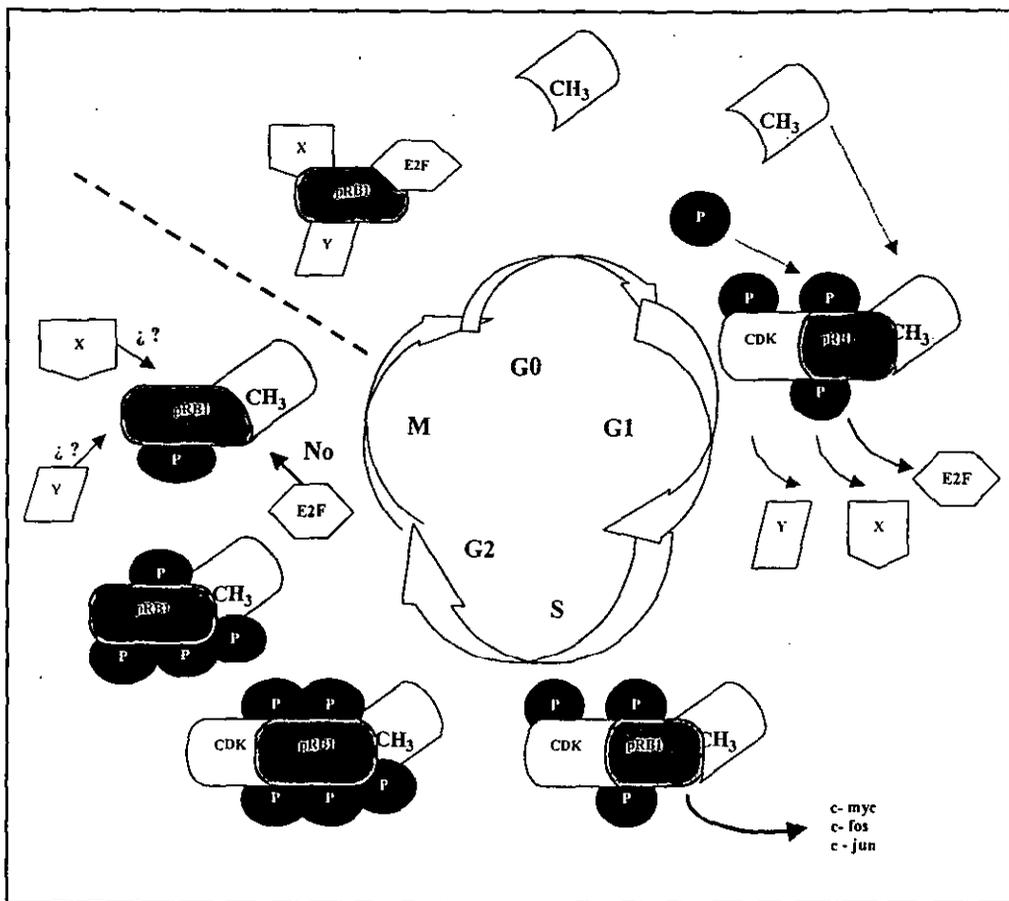


Figura 13.- Metilación del sitio de E2F.

La adhesión del grupo metilo al sitio de unión del factor E2F en la proteína pRB110, daría como resultado una alteración en el ciclo celular, provocando que la proteína perdiera su función inhibitoria y la expresión de los oncogenes permanezca.

XII. CONCLUSIONES

1. El RB en la población Mexicana se comporta de manera similar a otras poblaciones ya que tanto el hereditario como el no hereditario se presentan en una proporción similar a lo descrito en la literatura, siendo la leucocoria la principal característica seguida por el estrabismo.
2. Al no detectarse mutaciones en la región promotora ni en la secuencia de los 27 exones es posible que existan mecanismos o vías diferentes a las mutaciones, los cuales pueden participar en el desarrollo del tumor.
3. El diagnóstico molecular requiere de otros planteamientos para identificar los procesos involucrados en el desarrollo del retinoblastoma.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

XIII. REFERENCIAS

- Blanquet V., Turleau N., De Grouchy J. 1991. "Molecular detection of constitutional deletions in patients with retinoblastoma", *Am. J. Med. Genet.* 39:355-361.
- Blanquet V., Gross M., Turleau C. 1994 "Three novel germline mutations in exon 8 and 18 of the retinoblastoma gene", *Hum. Mol. Genet.* 3:1185-1186.
- Caron de Fromental C., Soussi T., 1992. "TP53 tumor supresor gene: a model of investigation in human mutagenesis", *Genes Chromosomes Cancer* 4:1-15.
- Chao, R., Khan W., Hannun Y. A., 1992. "Retinoblastoma protein dephosphorylation induced by D-erythro-sphingosine", *The J. Biol. Chem.*, 267:33:23459-23462.
- Cowell J. 1991 "The genetics of retinoblastoma" *Br. J. Cancer* 63:333-336.
- Cowell, J., Britta B., Akoulitchev, A., 1996 "A novel mutation in the promotor region in a family with a mild form of retinoblastoma indicates the location of a new regulatory domain for the RB1 gene", *Oncogene*, 12:431-436.
- Dbaibo, G. S., Wolff, R. A., Obeid, L. M., Hannun, Y. A., 1995. "Activation of a retinoblastoma-protein-dependent pathway by sphingosina", *Biochem. J.*, 310:453-459.
- Díaz M., Orozco L., 1992. "Estudio clínico-genético del retinoblastoma", *Boletín Médico Hospital Infantil de México*, 49:175-179.

- Di flore, B., Palena, A., Felsani, A., Palitti, F., Caruso, M., Lavia, P., 1999. "Cytosine methylation transforms an E2F site in the retinoblastoma gene promoter into a binding site for the general repressor methylcytosine-binding protein 2 (MeCP2)", *Nucleic Acids Research*, 14:2852-2859.
- Dunn J., Phillips R. Becker A. 1988 "Identification of germline and somatic mutations affecting the Retinoblastoma Gen", *Science* 241:1797-1800.
- Erlich, H. A., 1989. "PCR technology, Principles and applications for DNA amplification", Stockton Press, 1-245.
- Gallie, L., Joremy, A., 1990. "Biology of disease. Mechanism of oncogenesis in retinoblastoma", *Lab. Invest.*, 62:175-179.
- Greger, V., Debus, N., Lohmann D., Höpping, W., Passarge, E., Horsthemke, B., 1994. "Frequency and parental origin of hypermethylated RB1 alleles in retinoblastoma", *Hum. Genet.*, 94:491-496.
- Gorgoulis, V.G., Zacharatos, P., Kotsinas A., Liloglou T., Kyroudi, A., Veslemes, M., Rassidakis, A., Halazonetis, D.T., Fiel, J.K., Kittas, C., 1998. "Alterations of the p16-pRB pathway and the chromosome locus 9p21-22 in non-small-cell lung carcinomas", *Am. J. Patol.* 6:1749-1765.
- Hamel, P.A., Gallie, B.L., Phillips, R.A., 1992. "The retinoblastoma protein and cell cycle regulation", *Reviews*, 5:1234-1239.
- Hollingsworth R., Carmel E., Wen-Hwa I., 1993 "Retinoblastoma protein and the cell cycle" *Curren. Option in Genetics and Development.* 3:55-62.
- Kevin N., Douglas C., 1996. " Domains A and B in the Rb pocket interact to form a transcriptional repressor motif", *Mol. Cell. Biol.*, 9:4862-4868.

- Knudson, A., 1971. "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma", J. NIH Res., 2:67:72.
- Knudson, A., 1996. "Hereditary cancer : two hits revisited", J. Cancer Res. Clin. Oncol., 122 :3: 135-140.
- Lewin, B., 1997 "Genes VI", Oxford University Press, pp. 1-1260.
- Linn, A., 1994. en : Emery&Rimons. "Retinoblastome". 1997., Principles & Practies of Medical Genetics, 3a ed. Il Churchill Livingstone, USA. 1-345.
- Lohmann, D.; Brandt, R.; Hopping, W., 1994 "Distinct RB1 gène mutations with low penetrance in Hereditary retinoblastoma", Hum. Genet., 94:4:349-354.
- Lohmann, D.; Brandt, R.; Birgit, B., 1997 "Constitucional RB-gene mutations in patiens with isolated unilateral retinoblastoma", Am. J. Hum. Genet., 61:282-294.
- Macias V., M., Orozco, L., 1998. "Retinoblastoma, aspectos moleculares", Biología Molecular en el Diagnóstico Clínico, McGramHill, México, D.F., pp. 1-80.
- Macias V., M., 1998. "Detección de mutaciones en pacientes con retinoblastoma", Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, pp. 1-97.
- McGee T., Yandell D., Dryja T., 1989. "Structure and partial genomic séquense of the human retinoblastoma susceptibility gene", Gene, 80:119-128.
- Mitchell C., Cowell J. 1988 "Molecular evidence that the esterease-D gene lies proximal to the retinoblastoma susceptibility locus in chromosome region 13q14." Hum. Genet. 81:57-60.

- Mullis, K., B., Faloona, F., 1987. "PCR", *Meth. Enzymol.*, 155:335.
- Naumova, A.; Sapienza C. 1994 "The genetics of retinoblastoma", *revisted. Am. J. Hum. Genet.*, 54:264-273.
- Ohtani-Fujita, N., Fujita, T., Aoike, A., Osifchin, N.E., Robbins, D.P., Sakai, T., 1993. "CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene", *Oncogene*, 8:1063-1067.
- Orita, M., Youichi S., Kenshi, H., 1989. "Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction", *Genomics*, 5:874-879.
- Shimizu, T., Toguchida J., Kato M., 1994. "Detection of mutations of the RB1 gene in retinoblastoma patines by using exon-by-exon PCR-SSCP analysis", *Am. J. Hum. Genet.*, 54:793-800.
- Shirodkar S., Ewen M., DeCaprio J., 1992. "The transcription factor E2F interacts with the retinoblastoma product and a p107-Cyclin A complex in a cell cycle-regulated manner", *Cell*, 68:157-166.
- Simpson, D.J., Hibberts N.A., Mcnicol, A. M., Clayton, R.N., Farrell W.E., 2000. "Loss of pRb expression in pituitary adenomas in associated with methylation of the RB1 CpG island", *Cancer Res.*, 60:1211-1216.
- Slater J. 1986 "Experiments in molecular biology", Humana Press, pp. 1-377.
- Thoney, F.; Mounier, F.; Balmar, A. 1996 "Le retinoblastoma: aspects cliniques et diagnostic moleculaire", *Scweiz-Rundsch-Med-Prax*, 85:1058-1062.
- Watson, J.D., 1992 "The polymerase chain reactions en: Recombinant DNA." 2a. Edición, ED. Scientific Americans Books, U.S.A., 79-95 pp.

- Weatherall, D., 1991 "The news genetics and clinical practice", 3a ed. Oxford University Press, Oxford, 1-376.
- Weinberg, A., 1995 "The retinoblastoma protein and cell cycle control", *Cell*, 81:323-330.
- Weinber, R., 1991 "Tumor suppressor genes", *Science*, 254:1138-1146.
- Xuqiu, T., Wang, J.Y.J., 1998. "The caspase-RB connection in cell death", *Trends in Cell Biology*, 8:116-120.
- Yandell D., Dryja T. 1989 "Sequencing of alleles at the human retinoblastoma locus: application to cancer diagnostic and genetics counseling, en : "Molecular Diagnostics of Human Cancer", *Cancer Cells*. Cold Spring Harbor Laboratory, Massachusetts, U.S.A., 223-227 pp.
- Zacksenhaus, E., Montgomery R. G., Phillips A., Gallie B.L., 1993. "Molecular cloning and characterization of the mouse RB1 promoter", *Oncogene*, 8:2343-2351.

ANEXO 1

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

REACTIVOS PARA LA EXTRACCIÓN DE DNA DE SANGRE PERIFERICA

- * RCBL : Solución de lisis de células rojas.

- TRIS pH 7.6 10 mM
- MgCl₂ 5 mM
- NaCl 10 mM

- * WCLB : Solución de lisis de células blancas.

- TRIS pH 7.6 10 mM
- EDTA pH 8 10 mM
- NaCl 50 mM
- SDS 0.2 %
- Proteinasa K200 µg/ml

- * Fenol Saturado:

- H₂O Estéril 333.3 ml
- Fenol a 68°C 500.0 ml
- TRIS HCl pH 8 1M 6.6 ml
- NaOH 10mM 488.3 µl

- * Cloroformo

- * Agua destilada estéril

- * Etanol absoluto NaCl 1M

- * Cloroformo / alcohol isoamilico (24/1)

- * Gel para SSCP:

- Poliacrilamida con glicerol 10 % 80 ml
- TEMED reactivo concentrado 60 μ l
- Persulfato de amonio 10 % 540 μ l

Los últimos reactivos se mezclan y la solución obtenida se coloca rápidamente en la cámara de electroforesis para SSCP sin que le queden burbujas de aire, se deja polimerizar y posteriormente se carga con buffer TBE 1 X.

- * Oligonucleótidos para PCR de la región promotora.

ANEXO 2

EQUIPO

1. Balanza analítica (Sartorius).
2. Cámara de electrofóresis para SSCP
3. Cámaras de lucita para protección de radioisótopos.
4. Campana de extracción para gases (Labconco).
5. Campana de protección para radioisótopos (Labconco).
6. Contador Gaiger.
7. Cassettes para autorradiografías.
8. Centrífuga clínica.
9. Congelador -20 °C (American).
10. Congelador - 70°C (Revco).
11. Cristalería de laboratorio.
12. Equipo de televisión, cámara y revelador fotográfico.
13. Espectrofotómetro Spectronic 1001 Plus (Milton Roy Field).
14. Fuente de poder de 200 V (Sigma Chemical Co).
15. Fuente de poder de 500 V (Hoffer Scientific Instruments).
16. Gasas.
17. Gene Amp PCR System 9600 (Perkin Elmer Biotechnology).
18. Guantes desechables.
19. Horno de microondas.
20. Microcentrifuga (Fotodyne).
21. Micropipetas : 0.5 – 10 µl, 50 – 200 µl y 200 – 1000 µl.
22. Pantalla de lucita para protección de radioisótopos.
23. Placas para autoradiografía.
24. Puntas para pipeta y tubos eppendorf de plástico (0.6 y 1.5 ml).
25. Secador de geles Drygels (Hoffer Scientific Instruments).
26. Sistema de electroforesis submarina (Sigma Chemical Co.).
27. Transiluminador (Fotodyne).