

*M en BE Miguel Macías Vega*

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas**

**MECANISMOS DE ONCOGÉNESIS DEL RETINOBLASTOMA.**

M. en B. E. Miguel Macías Vega

Tesis para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS**



Director : Dra. Lorena Orozco.

Asesor : Dr. Patricio Gariglio.

Asesor : Dr. Vicente Madrid.



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.

Esta tesis se realizó en el Instituto Nacional de Pediatría bajo la dirección de la Dra. Lorena Orozco. Con asesoría en el laboratorio de Genética Molecular y Cáncer del CINVESTAV bajo la dirección del Dr. Patricio Gariglio y en el laboratorio de Infecciones Crónicas y Cáncer bajo la dirección del Dr. Vicente Madrid.

La realización de esta tesis se logro con apoyo económico del CONACYT al proyecto con numero de registro **30714-M** y la DGAEP de la UNAM.

*Dedicatorias.....*

**No le cuentes a nadie hacia donde vas  
Porque sólo tu sabes como vas caminando.....**

**( Comandante José Escobar ☐ )....** 

**Agradecimientos**

Al **CONACYT** por el apoyo brindado mediante el proyecto **30714-M**.

Al **CONACYT** por la beca No. **95354** otorgada al **M. en B.E. Miguel Macías vega**.

A la **Dirección General de Apoyo a Estudiantes de Posgrado** de la UNAM.

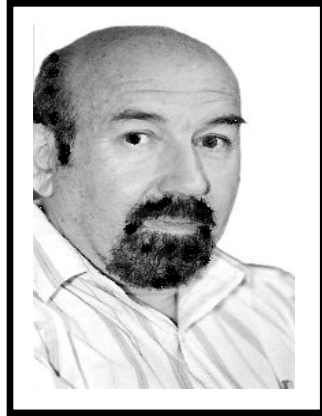
Al **Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas** de la **Facultad de Medicina** de la UNAM.

A la **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**.

Al **Instituto Nacional de Pediatría**.

Todo mi agradecimiento, admiración y reconocimiento a los doctores :

**Dr. Patricio Gariglio**




**Dr. Vicente Madrid.**



**Especialmente a la Dra. Lorena Orozco.**



*Un agradecimiento muy especial a la Dra. Lorena Orozco ya que sin su valioso apoyo, no hubiesen sido posibles, la realización de esta tesis y toda mi formación profesional ..... *

<b>INDICE</b>	<b>Página</b>
<b>Abstract</b>	11
<b>Resumen</b>	12
<b>INTRODUCCIÓN</b>	13
Origen celular del retinoblastoma	13
Manifestaciones clínicas	16
Diagnóstico	16
Tratamiento	18
Herencia del retinoblastoma	19
Hipótesis de Knudson	23
Mapeo del gen <i>RB1</i>	25
Estructura del gen <i>RB1</i>	26
Función de la proteína pRB110 en el ciclo celular	28
Regulación de la proteína pRB110	29
Características estructurales de las proteínas de la familia RB	31
Mecanismos de inactivación del gen <i>RB1</i>	32
I.- Mecanismos que causan pérdida de heterocigocidad (LOH)	32
II.- Mecanismos que no causan LOH	32
Mutagénesis del gen <i>RB1</i>	33
Neoplasias no oculares asociadas al gen <i>RB1</i>	34
Otros genes de la familia RB	35
Asociación de la proteína pRB110 con las oncoproteínas virales	
E6/E7 del VPH	37
Participación del VPH en diferentes tipos de cáncer	38
El papel del VPH en el carcinoma de cérvix	40
Características estructurales y funcionales del VPH	41
Antecedentes clínicos de asociación del VPH con el retinoblastoma	44
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	45
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	45
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>	45
<b>DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	46
<b>ESTRATEGIA</b>	46



PRIMERA ETAPA <b>Búsqueda de mutaciones en el gen <i>RB1</i></b>	47
Diagrama de flujo 1	48
SEGUNDA ETAPA <b>Análisis de la participación del VPH</b>	49
Diagrama de flujo 2	50
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	51
I.- Obtención de muestras	51
II.- Recopilación de muestras de DNA	51
III.- Búsqueda de mutaciones en el gen <i>RB1</i>	51
IV.- Análisis de pérdida de heterocigocidad (LOH) por RFLPs (Fragmentos de restricción de longitud polimorfica)	55
V.- Detección del VPH por amplificación del genoma viral	55
VI.- Detección del VPH por amplificación <i>in situ</i> del genoma viral	57
VII.- Expresión de pRB110, E6/E7 por hibridación <i>in situ</i>	58
VIII.- Detección por inmunohistoquímica de las proteínas pRB110, E6/E7.	58
IX.- Western blot de proteínas implicadas en el desarrollo del retinoblastoma (pRB110, pRB106, Ciclina E, Cdk2 y p21).	59
X.- Análisis de expresión del gen <i>RB1</i> en muestras de tumores.	61
<b>RESULTADOS</b>	62
Patrones electroforéticos anormales detectados por PCR/SSCP.	62
Análisis de pérdida de heterocigocidad (LOH)	64
Análisis de expresión del gen <i>RB1</i> en muestras de tumores por Transcripción reversa ( <i>in vitro</i> e <i>in situ</i> ) e Inmunohistoquímica.	71
Búsqueda del genoma viral en muestras tumorales.	75
<b>DISCUSIÓN</b>	80
<b>CONCLUSIONES</b>	87
<b>REFERENCIAS</b>	89
<b>ANEXO I.- Extracción y Purificación del DNA.</b>	107
<b>ANEXO II.- Preparación de productos para secuenciación.</b>	110
<b>ANEXO III.- CLONACIÓN DE LAS SONDAS PARA HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i>.</b>	112
<b>ANEXO IV.- Inmunohistoquímica.</b>	123
<b>ANEXO V.- RT-PCR <i>in situ</i></b>	126
<b>ANEXO VI .- Datos clínicos importantes de los pacientes.</b>	129

<b>FIGURAS</b>	<b>Página</b>
Figura 1.- <b>Corte transversal de la Retina.</b>	14
Figura 2.- <b>Leucocoria</b> , es el principal signo de diagnóstico del tumor.	17
Figura 3.- <b>Estrabismo</b> , es la segunda causa de diagnóstico del retinoblastoma.	17
Figura 4.- Pedigrí de una familia con <b>Retinoblastoma NO hereditario.</b>	21
Figura 5.- Pedigrí de una familia con <b>Retinoblastoma hereditario.</b>	22
Figura 6.- <b>Ley de Knudson.</b>	24
Figura 7.- Estructura del <b>gen RB1 y proteína pRB110</b>	27
Figura 8.- <b>Procesos de activación transcripcional y ciclo celular.</b>	30
Figura 9.- <b>Modelo tridimensional del VPH.</b>	43
Figura 10.- <b>Amplificados de la secuencia del promotor del gen RB1.</b>	67
Figura 11.- <b>Amplificados de diferentes exones del gen RB1.</b>	68
Figura 12.- <b>Patrones electroforéticos de SSCP en secuencias normales.</b>	69
Figura 13.- <b>Secuenciación automatizada.</b>	70
Figura 14.- <b>Síntesis de cDNA.</b>	72
Figura 15.- <b>Síntesis de cDNA in vitro.</b>	72
Figura 16.- <b>Síntesis de cDNA in vitro.</b>	73
Figura 17.- <b>Muestras positivas por Inmunohistoquímica.</b>	74
Figura 18.- <b>Amplificados de control.</b>	76
Figura 19.- <b>Co-amplificados del exon 11 del gen RB1 y VPH.</b>	77
Figura 20.- <b>Prueba de sensibilidad.</b>	77
Figura 21.- <b>Análisis por PCR in situ.</b>	78
Figura 22.- <b>Tumor RB negativo.</b>	79
Figura 23.- <b>Análisis por Inmunohistoquímica (IHQ).</b>	79
Figura 24.- <b>Integridad de RNA en geles de agarosa.</b>	128
Figura 25.- <b>Síntesis de cDNA de <math>\beta</math>-Globina.</b>	128

## **CUADROS**

<b>CUADRO 1.- Condiciones para la mezcla de reacción de PCR.</b>	<b>52</b>
<b>CUADRO 2.- Condiciones para la reacción de SSCP.</b>	<b>53</b>
<b>CUADRO 3.- Condiciones de reacción para detección del DNA viral.</b>	<b>57</b>
<b>CUADRO 4.- Edad de inicio del padecimiento en los pacientes incluidos en este estudio.</b>	<b>62</b>
<b>CUADRO 5.- Mutaciones detectadas en los pacientes analizados.</b>	<b>65</b>
<b>CUADRO 6.- Polimorfismos encontrados en pacientes con RB.</b>	<b>66</b>
<b>CUADRO 7.- Pérdida de heterocigocidad (LOH) en pacientes con RB.</b>	<b>66</b>
<b>CUADRO 8.- Número de muestras analizadas por transcripción reversa <i>in situ</i>, <i>in vitro</i> o por ambas.</b>	<b>71</b>
<b>CUADRO 9.- Protocolo de restricción para la linearización de plásmidos en secuencias 5' - 3'.</b>	<b>116</b>
<b>CUADRO 10.- Protocolo de restricción para la linearización de plásmidos en secuencias 3' – 5'.</b>	<b>116</b>
<b>CUADRO 11.- Mezcla de reacción para marcaje de sondas con Secuencias 5' – 3'.</b>	<b>118</b>
<b>CUADRO 12.- Mezcla de reacción para marcaje de sondas con Secuencias 3' – 5'.</b>	<b>118</b>
<b>CUADRO 13.- Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para sintetizar el cDNA del gen <i>RB1</i>.</b>	<b>127</b>

## **Abstract**

Retinoblastoma (RB) is the most common malignant tumor in childhood affecting 1:20,000 young children worldwide. In Mexico represents the second most frequent neoplasia in pediatric patients. The development of a tumor requires two mutational events at the *RB1* gene locus however, a low percentage (20%) of patients with hereditary retinoblastoma and without mutations associated to the tumor has also been previously documented in addition, controversial studies about the participation of HPV in the development of the retinoblastoma exist, some of them include patients from the Instituto Nacional de Pediatría affected with sporadic RB. The objective of this study was to determine which are the mechanisms of oncogenesis of the retinoblastoma in pediatric patients from Instituto Nacional de Pediatría. 48 patients were screened for *RB1* gene mutations in both peripheral blood and tumor specimens using single strand conformation polymorphisms (SSCP) approach followed by sequencing. Of the patients included 21 (43.8%) cases were bilateral and 27 (56.2%) were unilateral. Interestingly, 51.8% of unilateral patients developed the tumor before 1 year of age and 10 of them (71.4%) were diagnosed before the 6 months of age. Thirteen different oncogenic mutations were detected in 14/48 (29.2%) patients, 9 of which were germline (64.3%). Six of these mutations are novel (IVS3-1G>T, 125X, 389X, 610X, 750X and -149G>T). The most frequent types of mutation were frameshift and nonsense (30.8% each). Moreover, 5 intronic variants were identified, two of which are novel (g.41908 C/A and g.161976del6T). Loss of heterozygosity of the *RB1* gene was assessed by intron1/*Bam*HI and intron17/*Xba*I intragenic markers being higher in tumors with mutations (76.9% vs 34.8%). The remaining patients without mutations associated were analyzed to assess the expression of *RB1* gene in their tumor samples. The mRNA was extracted from 68 tumor samples and transcribed to cDNA by *in situ* and *in vitro* Reverse Transcription, all positive samples were analyzed by Immunohistochemistry to look for the pRb protein. The analysis revealed that only 14.7% of patients were positive for the transcription to cDNA and also to the protein detection. The screening to look for HPV in tumor samples by mean of Immunohistochemical, *in vitro* and *in situ* PCR was not informative. The low mutations detection rate and the earlier age at diagnosis in unilateral retinoblastoma cases suggest that other *RB1* inactivating mechanisms no associated to the HPV could be present in the retinoblastoma development and could support the recent statements of an alternative way for the predisposition to develop RB associated to other *RB1* inactivating mechanisms including the possible participation of single nucleotide polymorphisms present on the sequence of the *RB1* gene supporting the recent statements made by important research groups.

## Resumen

El retinoblastoma (RB) es el tumor maligno más común en la niñez afectando a 1:20,000 niños en todo el mundo. En México representa la segunda neoplasia más común en pacientes pediátricos. El desarrollo del tumor requiere de dos eventos mutacionales en el locus del gen *RB1* sin embargo se ha reportado un bajo porcentaje (20%) de pacientes afectados con la forma hereditaria pero sin mutaciones asociadas al tumor, además existen estudios controversiales relacionados con la participación del VPH en el desarrollo del retinoblastoma, alguno de los cuales incluye pacientes del Instituto Nacional de Pediatría afectados con RB esporádico. El objetivo de este estudio fue determinar cuales son los mecanismos de oncogénesis del retinoblastoma en pacientes pediátricos del Instituto Nacional de Pediatría. 48 pacientes fueron tamizados en busca de mutaciones en el gen *RB1* en muestras de sangre periférica y de tejido tumoral mediante análisis de polimorfismos conformacionales de cadenas sencillas de DNA (SSCP) y secuenciación. 21 casos (43.8%) fueron bilaterales y 27 (56.2%) fueron unilaterales. Resulta interesante que el 51.8% de los pacientes afectados con la forma unilateral desarrollaron el tumor antes del primer año de edad y 10 de ellos (71.4%) fueron diagnosticados antes de los seis meses de edad. Se detectaron trece mutaciones oncogénicas diferentes en 14/48 pacientes (29.2%), 9 de las cuales son de origen germinal (64.3%). Seis de esas mutaciones son nuevas (IVS3-1G>T, 125X, 389X, 610X, 750X and -149G>T). Las mutaciones más frecuentes son del tipo “frameshift” y “nonsense” (30.8% respectivamente). También se detectaron 5 variantes intrónicas, dos de las cuales son nuevas (g.41908 C/A and g.161976del6T). Se analizó la pérdida de heterocigocidad del gen *RB1* empleando los marcadores intragénicos intron 1/*Bam*HI e intron 17/*Xba*I resultando ser mayor en los tumores que portan una mutación (76.9% vs 34.8%). Se analizó la expresión del gen *RB1* en las muestras tumorales de aquellos pacientes en los que no se encontraron mutaciones asociadas al tumor. Se extrajo el mRNA de 68 muestras tumorales y se transcribió a cDNA por transcripción reversa *in situ* e *in vitro*, todas las muestras positivas fueron analizadas por inmunohistoquímica en busca de la proteína pRb. El análisis reveló que sólo 14.7% de los pacientes fueron positivos tanto a la transcripción a cDNA como a la presencia de la proteína pRb. El tamizaje realizado para buscar el HPV en las muestras tumorales mediante Inmunohistoquímica, PCR *in situ* e *in vitro* resultó no informativo. El bajo índice de mutaciones detectadas y la edad temprana de diagnóstico en los casos con retinoblastoma unilateral sugiere que pueden existir otros mecanismos de inactivación del gen *RB1* no asociados al HPV así, estos resultados podrían apoyar las recientes propuestas de una vía alternativa para la predisposición a desarrollar el RB asociadas a otros mecanismos de inactivación incluyendo la posible participación de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) presentes en la secuencia del gen *RB1* apoyando las propuestas hechas recientemente por importantes grupos de investigación.

## **INTRODUCCIÓN**

El retinoblastoma (RB; MIM# 180200) es una neoplasia maligna de origen embrionario que generalmente se manifiesta antes de los 5 años de edad, como resultado de la inactivación del gen *RB1* en las células de la retina (Wiggs y cols, 1988; Shimizu y cols, 1994; Dyer, 2005). A nivel mundial tiene una incidencia de 1 por 20,000 nacidos vivos (Blanquet y cols, 1994) y clínicamente se caracteriza por la presencia de leucocoria, estrabismo y signos inflamatorios oculares (Díaz y Orozco, 1992).

### **Origen celular del retinoblastoma**

El retinoblastoma fue descrito por primera vez en 1957 por el médico holandés Pawius (Rehvrek, 1997) aunque en 1809 James Wardop se refirió al tumor como un *Hongo haemático*. En 1864, Verchow propuso que el tumor se originaba de los elementos gliales de la retina, en 1896 Collins notó una similitud entre el tejido del tumor y la retina embrionaria; en 1900 Verhoeff presentó evidencias histológicas de que el tumor se deriva de los retinoblastos (Albert, 1987). Por otra parte en 1995, el grupo de Nork propuso que las células fotorreceptoras (conos y bastones) son las células de origen del retinoblastoma (Nork, 1995).

En general, existen cuatro pasos importantes en el proceso de maduración de la retina a partir de células progenitoras las cuales, deben expandirse a través de divisiones celulares, salir del ciclo celular, comprometerse con una función celular en particular y entonces ejecutar el programa de diferenciación celular para cada tipo de célula (Dyer, 2005). Las siete principales clases de células que conforman la retina en los mamíferos (conos, bastones, células horizontales, amácrinas, bipolares, ganglionares y de la glía de Müller) (Figura 1) se generan a partir de una célula progenitora multipotencial (Livesey, 2001).

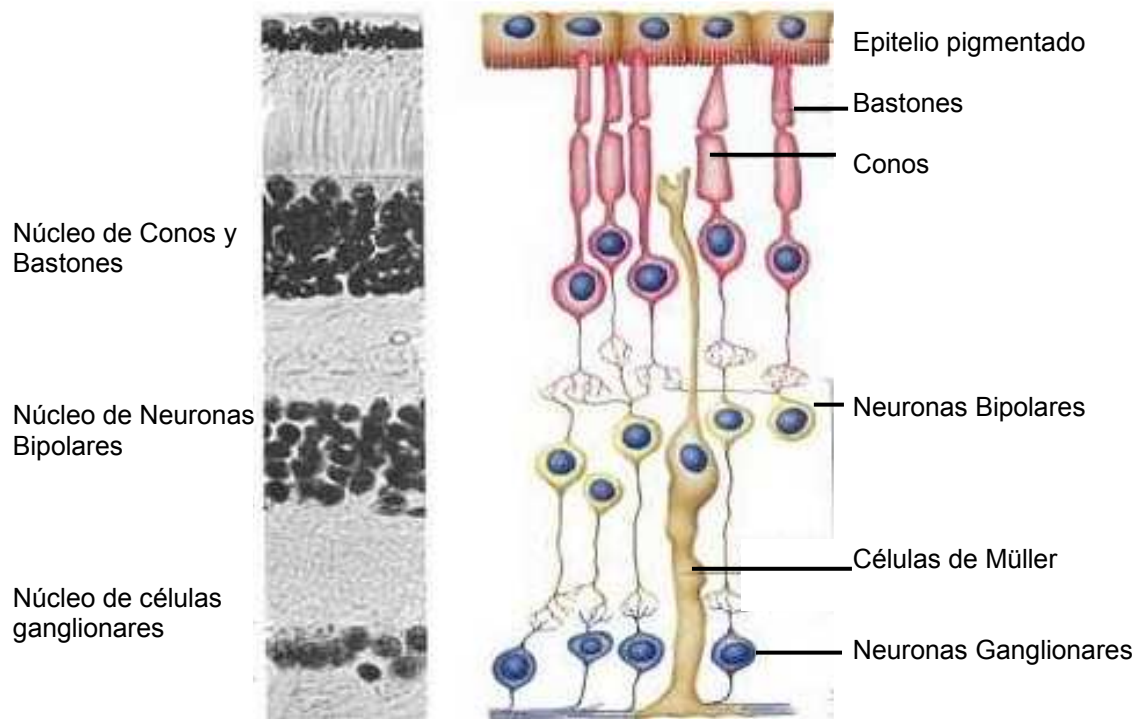


Figura 1.-**Corte transversal de la Retina.** Se muestran los principales tipos de células que constituyen la retina, la mayor parte son neuronas, algunas células son transductoras como los conos y bastones, otras, como las células bipolares, son integradoras (Darnell, 1990).

En el origen del retinoblastoma es importante considerar los siguientes puntos:

- a).- En los humanos, los conos son la segunda línea celular de la retina que alcanza su diferenciación en la semana 12 (justo después de las células ganglionares).
- b).- Las células de Müller nunca pierden su capacidad de proliferación y por lo tanto no explican que el retinoblastoma esté limitado a presentarse en la infancia.
- c).- Los conos para los colores rojo y azul son de las primeras células en completar su desarrollo en la retina normal además, constituyen la mayor parte de las células bien diferenciadas en el tejido tumoral.
- d).- Los bastones son de las últimas células de la retina que completan su actividad mitótica, además el tiempo en el cual esta puede ser controlada por el producto del gen *RB1* es muy corto e insuficiente para prevenir la tumorigénesis.
- e).- El retinoblastoma tiene lugar en células retinoblastoides inmaduras (Nork y cols, 1995).

Estos datos sugieren que el retinoblastoma se origina de una célula cuyo desarrollo es relativamente tardío como es el caso de los bastones que difícilmente pueden ser protegidos del defecto antineoplásico del embrión, donde además la proteína del gen *RB1* es el único factor antineoplásico que puede proteger a las células retinianas con maduración tardía. Por otro lado, debemos tomar en cuenta que el retinoblastoma está asociado a mutaciones inactivantes del gen *RB1*, las cuales ocurren durante la mitosis debido a errores en la replicación del DNA o en la recombinación mitótica. No obstante de acuerdo con Dyer (2005), la génesis del tumor no ocurre cuando el gen ha mutado sino hasta el momento en el que el producto génico es requerido; este evento puede ocurrir después de que han transcurrido varias generaciones celulares posteriores al momento en el que ocurre la primera mutación y aun después de la fase inicial de la expresión de la proteína pRB110.



## **Manifestaciones clínicas**

El retinoblastoma puede tener diversas formas de presentación clínica. La más frecuente es la leucocoria u “ojo de gato amaurotico” Figura 2. La leucocoria es un reflejo pupilar blanquecino que se presenta en el 60% de los casos. El estrabismo es la segunda forma más común de presentación con un 20%. Por este motivo, en todos los casos de estrabismo es indispensable hacer una exploración de fondo de ojo con una buena dilatación pupilar (Vaughan, 2000) Figura 3.

## **Diagnóstico**

Otras formas de presentación menos frecuentes son el ojo rojo y doloroso con afectación de la cámara anterior, que se da en un 7% de los casos aproximadamente. La disminución de la agudeza visual se encuentra en un 5% de los casos y suele presentarse en niños mayores debido a que ya pueden comunicar esta pérdida de la agudeza.

Más raramente, en un 3% de los casos el retinoblastoma se diagnostica como:

Dx1- un hallazgo casual en una revisión rutinaria de un paciente con antecedentes familiares de este tumor.

Dx2- como un glaucoma secundario asociado o no a buftalmia

Dx3- como una proptosis debido a una alteración orbitaria que simula una celulitis.

También se han descrito casos de retinoblastoma atípico en niños mayores o incluso adultos, con una presentación clínica de depósitos blanquecinos en cámara anterior o como una hemorragia vítrea con hifema que posteriormente desenvoca en hipertensión ocular secundaria. Otros signos y síntomas con una frecuencia conjunta menor de un 5% son Hifema espontáneo, Heterocromía de iris, Neovascularización del iris, Celulitis orbitaria, Nistagmus, Hemorragia vítrea, Anisocoria (González, 1995, Vaughan, 2000).

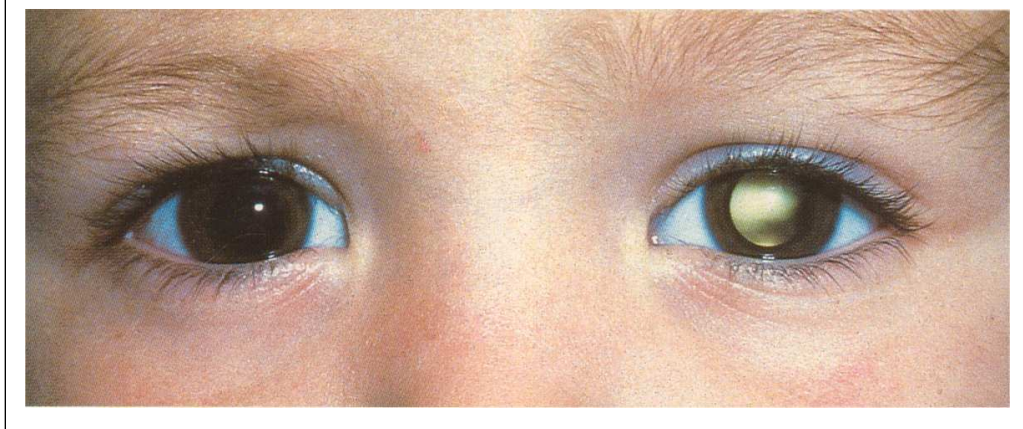


Figura 2.- **Leucocoria**, es el principal signo de diagnóstico del tumor.



Figura 3.- **Estrabismo**, es la segunda causa de diagnóstico del retinoblastoma.

## **Tratamiento**

El tratamiento del retinoblastoma se plantea en función de la edad del paciente, el tamaño del tumor, su localización y si es unilateral o bilateral.

Entre los diversos tratamientos que se llevan a cabo, la enucleación (extirpación del globo ocular) además de la extracción de un segmento de nervio óptico, suele ser el tratamiento de elección en la mayoría de los tumores de gran tamaño, ya que en estos casos el tumor está bastante desarrollado y generalmente ya se ha perdido la visión, sobretodo en las situaciones de retinoblastoma unilateral extenso. La enucleación es una terapia recomendada solamente si se considera que los otros tratamientos alternativos no van a ser efectivos o si la vida del niño corre peligro.

Cuando se ha extirpado el ojo, éste es analizado por el servicio de anatomía patológica para descartar la presencia de células de retinoblastoma en el nervio óptico y en los vasos sanguíneos, y también para determinar la extensión del tumor en la parte anterior del globo ocular. Si se detecta alguna de estas características, el tratamiento a seguir es con quimioterapia y/o radioterapia.

En los casos bilaterales, el tratamiento habitual es la enucleación del ojo que tiene peor pronóstico y radioterapia, fotocoagulación o crioterapia del ojo contralateral, el tratamiento del segundo ojo depende del tamaño y la localización del tumor. La radioterapia es el tratamiento principal cuando queda alguna posibilidad de mantener un cierto grado de visión.

En algunos casos, se administra quimioterapia previamente a la aplicación de la radioterapia en placas con la finalidad de reducir el tamaño del tumor.

La crioterapia puede utilizarse en el tratamiento de tumores periféricos de pequeño tamaño, de hasta 6 mm. Las células tumorales son destruidas por hipotermia. Otra posibilidad terapéutica en determinados tumores pequeños que no afectan ni al nervio ni a la mácula es la fotocoagulación que consiste en sellar con rayos láser los vasos sanguíneos que irrigan el tumor, para de esta manera destruir el tejido tumoral (<http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/retinoblastoma> National Cancer Institute USA).

## **Herencia del Retinoblastoma**

Existen dos formas de la enfermedad: **RB hereditario y RB no hereditario**; el 40 % de los casos son hereditarios y generalmente manifiestan la enfermedad antes del primer año de edad presentando el tumor de manera bilateral y multifocal; el 60 % de los casos no son hereditarios, manifiestan la enfermedad después del primer año de edad y el tumor generalmente se presenta de manera unilateral y unifocal. Por estudios de pedigrí se ha demostrado que entre el 10 y el 15 % de los casos hereditarios, también presentan el tumor de manera unilateral (Cowell, 1991; Díaz y Orozco, 1992; Orjuela, 2001) esto representa un enorme problema cuando se pretende realizar un diagnóstico clínico diferencial entre la forma unilateral hereditaria y la no hereditaria (Figuras 4 y 5). Es muy importante aclarar que actualmente en ambas formas de la enfermedad, es posible salvar la vida del paciente siempre que el tumor sea detectado tempranamente, aunque generalmente es necesaria la enucleación de por lo menos un ojo en aquellos casos afectados con la forma bilateral.

La predisposición para desarrollar ésta enfermedad se hereda con un patrón autosómico dominante y una penetrancia del 90% (Figura 5), esto significa que el 10% de los individuos que portan el gen anormal son asintomáticos (Scheffer y cols, 1989; Abramson, 1990; Jorgen y cols, 1990) sin embargo tienen un riesgo del 50% de heredar la enfermedad a cada uno de sus hijos (Carnevale y del Castillo, 1993), es por esta razón que en la mayoría de las familias con retinoblastoma, entre 80 y 90% de los portadores del gen anormal desarrollan tumores oculares (alta penetrancia) de manera bilateral y en algunos casos de manera múltiple (alta expresividad) pero en algunas familias, una proporción significativa de portadores (10%) son fenotípicamente sanos (penetrancia incompleta) y muchos individuos afectados que desarrollan retinoblastoma unilateral o retinocitomas benignos se consideran como casos de expresividad reducida (Harbour, 2001).

Actualmente se sabe que los pacientes con una mutación en la línea germinal tienen un elevado riesgo de desarrollar otro tipo de tumores además del retinoblastoma, entre ellos se encuentran osteosarcomas, sarcomas de tejido blando y melanomas. Clínicamente se ha reportado también que los casos hereditarios tienen un riesgo

400 veces superior de desarrollar tumores mesenquimatosos, tales como sarcoma osteogénico, fibrosarcoma y melanoma y se ha visto además, que existe un aumento aún mayor con la radiación terapéutica del hueso y tejidos blandos de la órbita, pues la radiación puede inducir el desarrollo del segundo evento mutacional propuesto por Knudson (1976), (<http://www2.uah.es/biomodel/citogene/horwitz/mshcance.htm>). Es importante mencionar que dado que el gen *RB1* tiene un papel importante en tejidos no retinoblastoides, también se han reportado mutaciones somáticas y LOH en el gen *RB1* asociadas en diferentes tipos de tumores incluyendo tumores de mama, cáncinomas de células escamosas cutaneas, próstata y Melanoma de tipo Uveal (Latil, 1999; Chibon, 2000; Wada, 2000; Scholes, 2001; O'Connor, 2001).

El gen *RB1*, al igual que el resto de los genes supresores, se caracteriza por ser recesivo a nivel celular, lo que significa que se requiere de la inactivación de ambos alelos para disparar el desarrollo del tumor, es decir, que aquellas células que contienen para el gen *RB1* un alelo normal y otro mutado son células heterocigotas que se comportan normalmente, sin embargo, existen varios mecanismos que pueden dar lugar a la pérdida del alelo normal y por consiguiente a la pérdida de heterocigocidad alélica, condición que enciende el desarrollo del tumor.

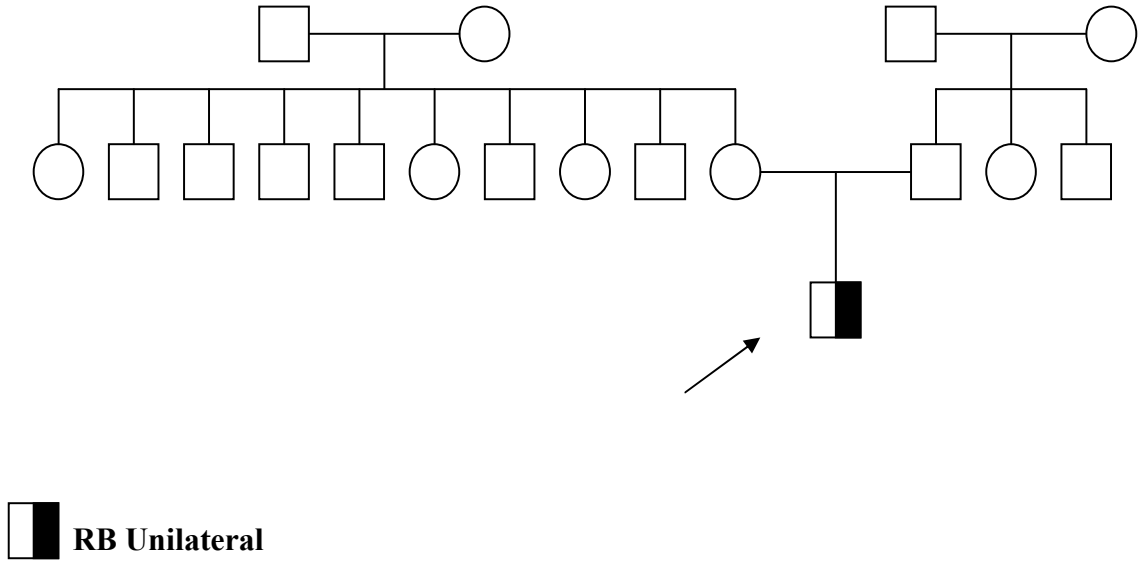
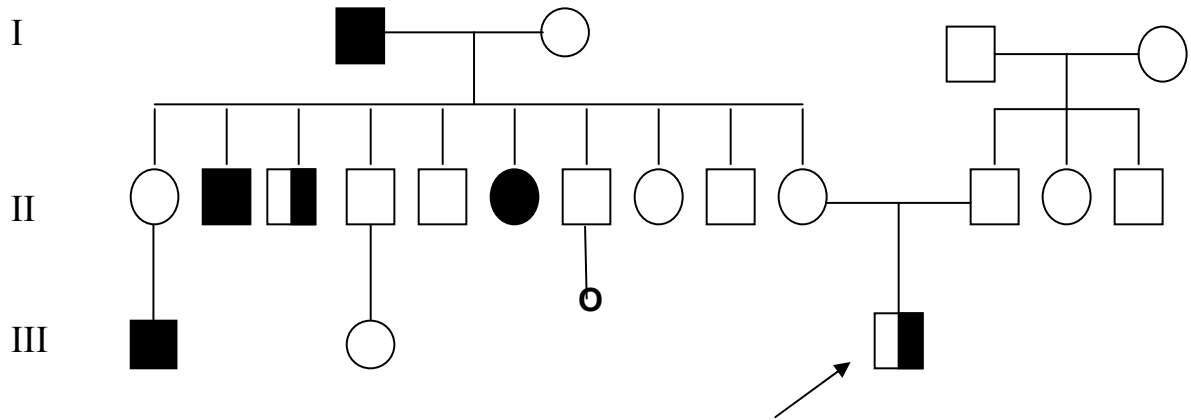


Figura 4.- Pedigrí de una familia con **Retinoblastoma NO hereditario**. La forma no hereditaria del retinoblastoma es aquella en la que el tumor ocurre por una mutación “*de novo*”, no existen antecedentes heredo-familiares y muy difícilmente se repite en una misma familia.







-  Hombre afectado con la forma unilateral
-  Hombre afectado con la forma bilateral
-  Mujer afectada con la forma bilateral
-  Aborto

Figura 5.- Pedigri de una familia con **Retinoblastoma hereditario**. En la forma hereditaria, cada uno de los individuos afectados tiene una posibilidad del 50% en cada embarazo de heredar la enfermedad a su descendencia. En esta forma de herencia el tumor generalmente se presenta de manera bilateral aunque en el 10-15% de los casos también puede presentarse de manera unilateral. Con la primer mujer de la generación II vemos claramente un caso de no penetrancia ya que ella es clínicamente sana sin embargo es portadora del gen mutado y ya lo ha heredado a su único hijo vivo.

### **Hipótesis de Knudson**

De acuerdo con un análisis estadístico del retinoblastoma, Knudson demostró que éste es un cáncer causado por dos eventos mutacionales, como resultado de los cuales ambos alelos del gen responsable del RB se inactivan y conducen al desarrollo del tumor. En el RB hereditario la inactivación del primer alelo ocurre en las células germinales mientras que la inactivación del segundo alelo se presenta en las células de la retina; en el RB no hereditario ambas mutaciones ocurren en las células de la retina. El tumor surge cuando ocurre una mutación somática en los retinoblastos en un proceso que inactiva la única copia normal del gen *RB1* (Knudson, 2002; Knudson 1996; Knudson, 1971). Dado que las mutaciones en el segundo alelo pueden ocurrir de manera independiente en distintas células, aquellos individuos con RB hereditario generalmente presentan tumores múltiples en uno o ambos ojos, mientras que en la forma no hereditaria comúnmente se observa un sólo tumor en el ojo afectado (Figura 6) (Thoney, 1996; Lohmann, 1997; Lohmann, 1994).

### **El primer evento mutacional: la mutación que predispone al RB**

De acuerdo con Knudson 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 mutaciones submicroscópicas y generalmente son mutaciones 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 heterocigota contiene un alelo alelo *RB1* normal y otro mutado *RB1*. Cuando el segundo evento ocurre la célula pierde la heterocigocidad (LOH) y se hace homocigota (*RB1-/RB1-*) lo cual fisiológicamente se traduce en pérdida de la función del gen *RB1*, mecanismo necesario para el desarrollo del tumor (Naumova y Sapienza, 1994; Weinber, 1991).



**RB Hereditario**

**RB NO hereditario**

Células somáticas en los padres



Células germinales en los padres. En la forma hereditaria el **primer evento** mutacional puede ocurrir en cualquiera de las células germinales.



Después de transcurrida la fecundación en la forma hereditaria se obtiene un cigoto que es portador de un alelo normal y de un alelo mutado producto del primer evento mutacional.

**CIGOTOS**



En la forma hereditaria las células somáticas del individuo generado a partir del cigoto portador de la primera mutación, conservan la heterocigocidad con un alelo mutado y el otro normal.



En la forma hereditaria, ocurre el segundo evento mutacional en las células de la retina causando la pérdida de la heterocigocidad.



Segundo evento

En la forma no hereditaria se inactivan los dos alelos únicamente en las células de la retina el resto de las células somáticas son normales.



primero y segundo eventos

Una vez que ambos alelos se han inactivado en ambas formas del retinoblastoma (hereditario y no hereditario), se desencadena el desarrollo del tumor.



El alelo mutado se transmite a la siguiente generación a través de las células germinales del paciente.



En la forma no hereditaria no existe riesgo de transmisión de la enfermedad.



(Modificado de Díaz y Orozco; 1992)

Figura 6.- **Ley de Knudson.** El retinoblastoma en ambas formas hereditario y no hereditario se desarrolla como consecuencia de la inactivación de los dos alelos del gen *RB1*.

### **Mapeo del gen *RB1***

El primer gen supresor del cáncer descubierto y prototipo de todos ellos fue el gen *RB1* y los primeros indicios de su ubicación fueron dados por estudios citogenéticos realizado en pacientes con retinoblastoma, donde aproximadamente el 5% de los casos tenían una delección en el brazo largo del cromosoma 13 (13q-). Las técnicas de bandeo de cromosomas permitieron demostrar que esta delección generalmente comprendía la región 13q14.1 - 13q14.3 (Francke, 1976; Yunis y Ramsey, 1978).

Para 1980 el único locus mapeado en el cromosoma 13 era el de la enzima esterasa D (ESD); este mismo año, el grupo de Sparkes (1980) demostró que uno de cada cinco pacientes con retinoblastoma y síndrome 13q-, tenían una reducción del 50% en la actividad de esta enzima. Este estrecho ligamiento entre el gen de la esterasa D y el gen de predisposición al retinoblastoma se confirmó después mediante el mapeo de las delecciones que involucraban a los dos genes (Lih-Jiuan y cols, 1988) mientras que otros grupos de investigación utilizaron sondas específicas para el cromosoma 13 obtenidas por fragmentos de restricción de DNA encontrando que una de estas sondas podía hibridar con una secuencia de marco de lectura abierto capaz de transcribirse y utilizarse para aislar el cDNA de 4.7 kb correspondiente al RNAm del gen *RB1* que codifica para una fosfoproteína de 928 aminoácidos (Richard, 2003; Friend, 1986).

Una vez que se caracterizó la secuencia del RNA mensajero, diferentes grupos se enfocaron a determinar la organización genómica del locus del retinoblastoma. Para ello, el grupo de McGee formó una genoteca que contenía todo el locus del retinoblastoma clonado en el bacteriófago  $\lambda$  gt11 lo cual permitió determinar con exactitud la ubicación y la estructura del gen *RB1* (McGee, 1989).

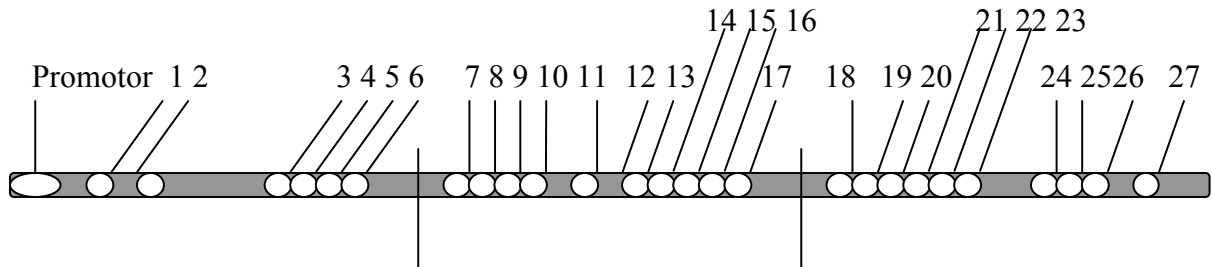
### **Estructura del gen *RB1***

El gen *RB1* se detectó cuando se encontraron asociados una forma de tumor maligna de la retina y una deleción en la región 13q14. El transcrito de este gen es codificado por 27 exones dispersos a lo largo de 200 kb del DNA genómico; los exones varían en tamaño de 31 a 1889 pb, los intrones van de los 80 pb hasta los 60 kb, y se transcribe en un RNA mensajero de 4.7 kb el cual se traduce en una fosfoproteína nuclear (pRB110) de 928 aminoácidos y un peso molecular de 110 kD cuando se encuentra hiperfosforilada y de 105 kD cuando está hipofosforilada (Figura 7) (Dunn y cols, 1988; Mitchell y Cowell, 1988; McGee y cols, 1989; Fung y Murphree, 1987).

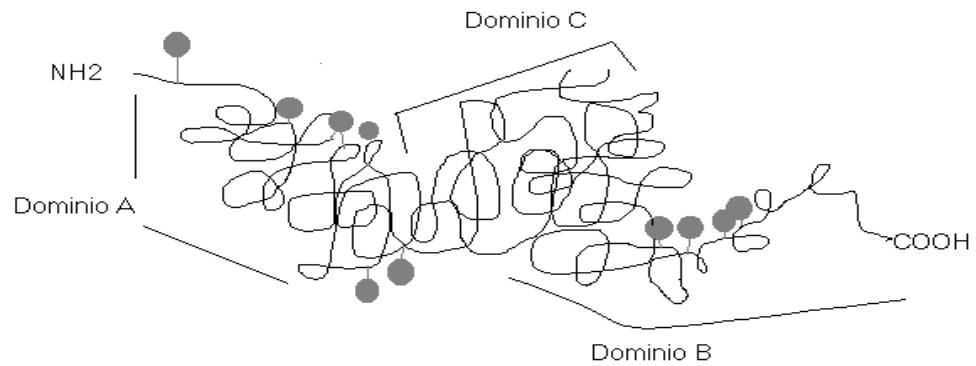
El extremo 5' de este gen está orientado hacia el centrómero y contiene una secuencia rica en el dinucleótido CpG característica de la región promotora de los genes constitutivos, en el promotor de este gen no existe una caja TATA y aunque ésta es una región rica en G+C, tampoco existen evidencias de una caja CAAT (Pier, 2002); no obstante existen secuencias *Alu* en los siguientes puntos: **(I)** en los extremos 3' de los exones 2 y 11, **(II)** en los intrones que flanquean al exón 14 y **(III)** en los extremos 5' de los exones 9 y 17.

La secuencia *Alu* localizada entre el exón 2 y el extremo 3' contiene dos secuencias altamente conservadas, la primera es GAGGCNGAGGC que corresponde a la secuencia de unión con el antígeno T del virus SV40, y la segunda es una secuencia asimétrica de función desconocida CCAGCCTGG que se localiza a ambos lados del exón 14. Los exones 14 y 15 están separados por un pequeño intrón, constituido casi en su totalidad por una secuencia *Alu* lo cual sugiere que estos exones alguna vez formaban un sólo exón y que éste se dividió en dos durante el desarrollo de la evolución. Finalmente, el extremo 3' contiene una secuencia señal de poliadenilación (ATA) y el exón 20 codifica para un dominio en la proteína pRB110 que funciona como zipper de leucina (McGee y cols, 1989).

## GEN DEL RETINOBLASTOMA



## PROTEINA pRB110



- Sitios de fosforilación

Figura 7.- **Estructura del gen *RB1* y proteína pRB110.** Cualquier mutación que ocurra en alguno de los 27 exones o sitios de "splicing" del gen *RB1*, es suficiente para alterar la estructura de la proteína pRB110 y por lo tanto para inhibir su función como regulador negativo del ciclo celular.

### **Función de la proteína pRB110 en el ciclo celular**

El gen *RB1* es un gen supresor de crecimiento tumoral que codifica para una proteína (pRB110) que regula de manera negativa el ciclo celular durante el paso de G1 a la fase S (Moshe, 2001; Kari, 2001; Helt and Galloway, 2003, Calzone 2008). La proteína pRB110 es una fosfoproteína de tipo nuclear que se expresa en todas las células, se une al DNA y de manera específica al factor de transcripción E2F, el cual pertenece a una familia de factores de transcripción que regulan la expresión de genes necesarios para que la célula entre a la fase S para la síntesis de DNA (Lei, 2001). La función normal de esta proteína es mantener a las células en G0 o G1 hasta que estén presentes los factores necesarios para que la célula avance a la fase S exitosamente; si estos factores no están presentes, entonces la célula normalmente sufre apoptosis (Tucker, 2002). En términos generales, durante la mitosis (**M**) la pRB110 se encuentra hipofosforilada, en su forma activa y tiene la capacidad de formar complejos con otras proteínas celulares y de manera específica con el factor regulador de la transcripción E2F; al final de **G0** y principios de **G1** la pRB interactúa con cinasas dependientes de ciclinas como la Cdk2 y ciclina E las cuales fosforilan e inactivan a la proteína pRB110 y al mismo tiempo el factor E2F y las proteínas celulares asociadas al complejo son liberadas e inducen en la fase **S**, la expresión de genes incluyendo algunos proto-oncogenes como c-myc, c-fos y c-jun cuyos productos promueven la división celular. La transición de **G1** a **S** es un punto de control muy importante en la cronología del ciclo celular. Cuando una célula encuentra señales que estimulan su crecimiento, las concentraciones de la familia de D de ciclinas aumentan con lo cual se activan CDK4 y CDK6. La fosforilación de pRB110 llevada a cabo por las CDKs permite superar el obstáculo de **G1** → **S** permitiendo que la célula entre en la fase de síntesis de DNA. El avance posterior de la fase **S** → **G2** está facilitado por el aumento de la ciclina A, que se une a CDK2 y CDK4. Al principio de **G2** la ciclina B forma complejos con CDK4 ayudando así a que la fase pase de **G2** a Mitosis (**M**). Al final de la fase **S** la interacción pRB/Cdks se pierde y la pRB110 regresa a su forma activa recuperando en la fase **M** del siguiente ciclo su capacidad para formar complejos inactivos con el factor E2F y otras proteínas celulares, efectuando nuevamente su función como inhibidor del ciclo celular. La pérdida de la función de la pRB110 conduce a una permanente activación

del ciclo celular, por lo tanto es una condición necesaria para el desarrollo del tumor (Ludlow y cols, 1989; Benedict y cols, 1990; Shirodkar y cols, 1992; Horowitz y cols, 1989; Canhoto, 2000; Satoshi, 2001; Hatta, 2002; Bekibele, 2002; Dyer, 2005).

### **Regulación de la proteína pRB110**

La represión celular mediada por pRB110 es inhibida a la vez que se activa la transcripción de genes requeridos para entrar a la fase S y a la síntesis de DNA; mientras tanto, E2F induce la expresión de las ciclinas E y A; a su vez el complejo de ciclinas E/Cdk2 colabora con el complejo de ciclinas D/Cdk 4 y 6 para completar la fosforilación de la pRB110 (Lei, 2001). Diferentes sitios sobre la pRB110 parecen ser fosforilados preferencialmente por complejos específicos de ciclinas/Cdks y la fosforilación sitio específica parece estar involucrada en distintas actividades bioquímicas, por ejemplo, la unión a E2F y proteínas que contienen el dominio LxCxE es regulado de manera específica por distintos sitios de fosforilación (Dick, 2002; Peter, 2001; Pier, 2002; Sterner, 1996; Todd, 2002; Calzone, 2008).

Los estudios realizados por Lei (Lei, 2001) sugieren que la fosforilación del extremo amino terminal por la ciclina D-Cdk4/6 inicia con un plegamiento del extremo carboxilo terminal para interactuar intra molecularmente con el dominio A/B, facilitando así la fosforilación de este dominio por el complejo ciclina E/Cdk2. Actualmente se sabe que existen al menos 10 aminoácidos susceptibles de fosforilarse y que la fosforilación ocurre exclusivamente en los aminoácidos serina y treonina lo cual es un punto clave para entender el papel de la forma hipofosforilada de la pRB110 en las células quiescentes y su transformación a la forma hiperfosforilada, tomando en cuenta que la forma predominante en la fase G2 es la hiperfosforilada (Peter, 2001; Marie, 2001). Por otro lado en el dominio C, se ha encontrado una docena de distintos sitios de fosforilación, no obstante, aun no se ha definido el número exacto de unidades de serina y treonina en la molécula de la pRB110 que pueden ser fosforiladas en este dominio durante la fase G1 (Pier, 2002) (Figura 8).

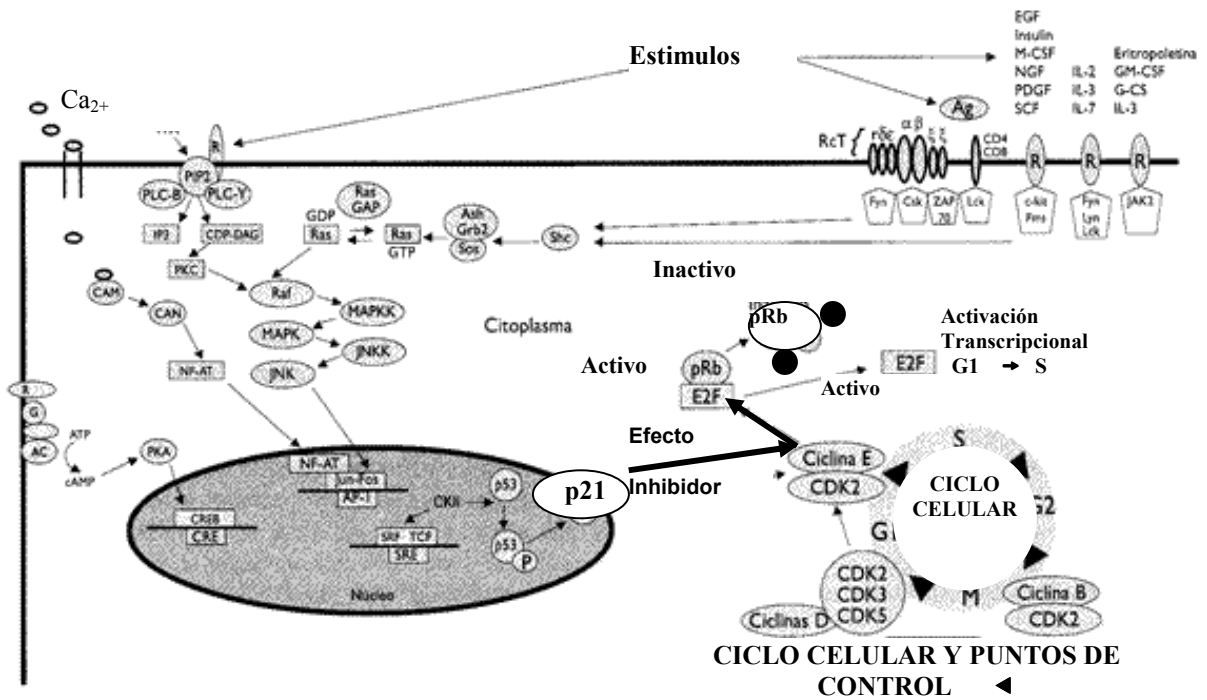


Figura 8.- **Procesos de activación transcripcional y ciclo celular.** La fosforilación de pRB110 es inducida por la CDK2 y la ciclina E, mientras que p21 puede bloquear a estas moléculas provocando la desfosforilación de la pRB110. Por otra parte, la sobre-expresión de la CDK2 y ciclina E puede ser causa de un estado de hiperfosforilación constante provocando que el factor E2F promueva la expresión de proto-oncogenes y por lo tanto del proceso de activación transcripcional sin control degenerando en un proceso neoplásico (Eijiro, 1997).

### **Características estructurales de las proteínas de la familia pRB**

Las tres proteínas de la familia RB consisten de un dominio amino terminal, una región compuesta de dos dominios conservados (A y B) denominada “pocket” separados por un tercer dominio (C) y un dominio carboxilo terminal. El término “pocket” se aplica al dominio altamente conservado a través del cual las proteínas pRB, p107 y p130 se pueden unir a oncoproteínas de origen viral y factores celulares del tipo de los factores de transcripción E2F. Las proteínas pRB110, p107 y p130 difieren entre sí en su capacidad de unirse a diferentes elementos de la familia E2F, por ejemplo, pRB110 se une a E2F1, E2F2 y E2F3 y p107/p130 se unen a E2F4 y E2F5 respectivamente (Helt and Galloway, 2003).

El dominio “pocket” es responsable de la interacción de la proteína con factores de transcripción, ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas y por lo tanto de su actividad funcional. La estructura cristalizada del dominio A de la pRB revela que está compuesto de nueve  $\alpha$  hélices, dos de ellas formando un núcleo hidrofóbico rodeado por las otras siete  $\alpha$  hélices. En el dominio A se encuentran 47 aminoácidos completamente conservados entre las tres proteínas de la familia RB, de los cuales 21 son polares y 26 no polares. La mayoría de los residuos no polares interactúan para estabilizar la estructura terciaria de las proteínas.

Los dominios A y B de la región “pocket” tienen una región que también es común a las ciclinas y al factor de transcripción TFIIB, cuenta con ocho hélices adicionales, un tallo extendido, y un arreglo del tipo  $\beta$ -plegado. Las conformaciones del dominio B son más semejantes a los que se encuentran en el dominio A para su unión a ciclinas. Ambos dominios A y B son requeridos para interactuar con factores de transcripción celular y oncoproteínas virales como E1A de adenovirus, antígeno T de varios poliomavirus y E7 del virus papiloma humano (VPH) (Helt y Galloway, 2003).



## **Mecanismos de inactivación del gen *RB1***

Actualmente se conocen diferentes mecanismos a nivel celular que causan la inactivación del gen *RB1* (Gallie y Joremy, 1990):

### **I.- Mecanismos que causan pérdida de heterocigocidad (LOH)**

**a) Pérdida de un cromosoma:** En este proceso la célula es portadora de un cromosoma 13 normal y otro mutado 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 sólo el cromosoma 13 portador de la mutación.

**b) 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.

**c) Recombinación mitótica:** En este proceso la pérdida del alelo puede ocurrir por la recombinación mitótica entre un cromosoma normal y su homólogo portador del gen mutado.

### **II.- Mecanismos que no causan LOH**

**a) Mutaciones de tipo puntual:** En condiciones de heterocigocidad del gen *RB1* basta con que el cromosoma normal sufra alguna mutación en el locus homólogo al del cromosoma mutado para inactivar al gen *RB1* y generar una célula con potencial suficiente para desencadenar el desarrollo del tumor.

Muchos de estos mecanismos se han confirmado mediante el análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) que flanquean al gen *RB1* por ejemplo, en algunos casos donde se ha confirmado la heterocigocidad para diferentes marcadores en tejidos somáticos normales, se ha logrado documentar la LOH en el

tejido tumoral indicando así la pérdida del alelo normal por alguno de los procesos mencionados (Weatherall, 1991).

**b) Metilación:** Generalmente la hipometilación de oncogenes es un aspecto común en las células malignas, este fenómeno da lugar a la activación de estos genes conduciendo a la oncogénesis y promoviendo el grado de malignidad. En contraste, la hipermetilación está involucrada en la transformación maligna dada por los genes supresores de tumores (Ohtani-Fujita, 1993).

En el retinoblastoma, existen varios reportes en los cuales se ha observado que la metilación del promotor de *RB1* se asocia al desarrollo del tumor en cerca del 10% de los casos con la forma esporádica. La metilación del *RB1* se ha documentado en pacientes donde no se han detectado alteraciones en la estructura del gen RB (Ohtani-Fujita,1993).

Otro ejemplo de la inactivación de los genes supresores de tumores por hipermetilación fue sugerida inicialmente en genes localizados en el brazo corto del cromosoma 11 (11p13 y 11p15) lo cual es relevante, cuando tomamos en cuenta que es en esa región donde se encuentran varios de los genes supresores de tumores como el tumor de Willms en el cual, existen al menos 2 genes supresores implicados: *WT1* en 11p13 y *WT2* en 11p15.

### **Mutagénesis del gen *RB1***

El constante análisis sobre las mutaciones que ocurren en el gen *RB1* ha permitido determinar que no existen regiones en la secuencia del gen que tengan una mayor predisposición a presentar mutaciones denominadas "puntos calientes" sino que éstas se presentan distribuidas a lo largo de todo el gen, tanto en secuencias codificantes (exones) como en secuencias no codificantes (intrones, sitios de "splicing" y la región promotora).

No obstante, las mutaciones más frecuentes son sustituciones de una sola base (>50 %) que involucran un cambio del tipo T a C (Lefevre, 2002) y con menor

frecuencia se encuentran transiciones, pequeñas deleciones o duplicaciones (>103 pb). Este tipo de mutaciones se han reportado tanto para mutaciones de tipo germinal como somáticas y todas son funcionalmente nulas. Datos recientes proponen que los di nucleótidos CpG podrían ser puntos calientes dentro del gen *RB1* debido a lo siguiente:

- I) El 30 – 40 % de todas las mutaciones puntuales conocidas en la línea germinal dan lugar a deaminaciones espontáneas de los sitios CpG metilados.
  
- II) El número de repetidos CpG en el DNA humano es muy bajo.
  
- III) Se ha observado un fuerte bloqueo de las islas CpG en las secuencias codificantes.
  
- IV) Experimentalmente se ha visto que las Islas CpG en la región promotora del DNA de mamíferos presentan una inherente resistencia a ser metiladas.

Es importante aclarar que el proceso de deaminación espontánea ocurre con alta frecuencia en regiones unicasenarias, especialmente en la cadena que no se transcribe, la cual, es reparada menos eficientemente que su cadena complementaria (Caron de Fromentel y Soussi, 1992). Además, como se mencionó anteriormente la hipermetilación de las islas CpG en el gen *RB1* podría ser un evento mutacional significativo causante del retinoblastoma.

### **Neoplasias no oculares asociadas al gen *RB1***

El gen *RB1* se ha encontrado mutado en el siguiente grupo de tumores no oculares: osteosarcoma (Linn, 1994), sarcomas de tejido blando, carcinoma pulmonar, carcinoma de mama, carcinoma de vejiga (Acikbas, 2002), carcinoma de riñón, carcinoma de próstata, carcinoma esofágico, cáncer de hígado, carcinoma de cérvix, adenomas de la glándula pituitaria (Ikeda, 2002), neuroblastomas (Perri, 2002), lesiones gástricas precancerosas (Zhou, 2002), melanomas (Alui, 2002, Sauter, 2002), leucemias (Sasaki, 2002), y adenocarcinomas (Xue, 2002). Se sabe que los

pacientes con retinoblastoma hereditario tienen mayor predisposición para desarrollar tumores secundarios de tipo no ocular.

Originalmente se pensó que los tumores secundarios eran el resultado del tratamiento con radioterapia, debido a que la mayoría de ellos aparecen en la zona radiada de pacientes con la mutación germinal; sin embargo, un buen número de niños afectados desarrollan tumores secundarios antes del tratamiento del tumor intraocular (Abramson, 1990). Además, se sabe que los individuos con retinoblastoma hereditario tienen un riesgo 200 veces más elevado de desarrollar tumores de tipo mesenquimatoso en etapas tempranas de su vida adulta, siendo los más frecuentes los osteosarcomas, fibrosarcomas y mielomas (Roarty y cols, 1988; Draper y cols, 1986; Toguchida y cols, 1988).

Las mutaciones en el gen *RB1* asociadas a tumores no oculares comúnmente son inducidas por factores ambientales (Linn, 1994), en contradicción con las mutaciones espontáneas que ocurren en el retinoblastoma. En este tipo de tumores existe un marcado incremento en la proporción de mutaciones dadas por inversiones con respecto a la sustitución y delección de bases. A diferencia del retinoblastoma, ninguna de las sustituciones reportadas ocurren en la isla CpG y no se ha encontrado coincidencia entre los puntos de mutación en el gen *RB1* del retinoblastoma y el de otras formas de cáncer. Esto es una fuerte evidencia de que los mecanismos mutagénicos espontáneos involucrados en el desarrollo del retinoblastoma son diferentes a los de las mutaciones involucradas en la etiología y desarrollo de otras formas de cáncer no ocular (Linn, 1994).

### **Otros genes de la familia RB**

Recientemente, además del gen *RB1* se han identificado dos genes humanos que comparten aspectos estructurales muy similares a los de otros genes constitutivos, como por ejemplo la ausencia de secuencias TATA ó CAAT comunes en los promotores de la mayoría de los genes diferencialmente expresados, la presencia de zonas ricas en G-C que comúnmente se encuentran en sitios de inicio de la transcripción, la presencia de múltiples secuencias consenso para la unión al factor de transcripción Sp1 y la presencia de múltiples sitios de inicio para la transcripción.

Estos dos genes que constituyen parte de la familia de genes RB conocidos como retinoblastoma like-1 (*RBL1*) y retinoblastoma like-2 (*RBL2*) (Dyer, 2005) se caracterizan por lo siguiente:

El gen ***RBL1***: Se localiza en la región 20q11.2, contiene 100 Kb y 22 exones que varían de 50 a 840 pb y codifica para una proteína de 107 kDa.

El gen ***RBL2***: Se localiza en la región 16q12.2, contiene 22 exones que varían en tamaño de 82 pb hasta 9 kb, codifica para una proteína de 130 kDa.

Al igual que la pRB110 codificada por el gen *RB1*, las proteínas p107 y p130 regulan la progresión del ciclo celular mediante interacciones con factores de la familia E2F y de la misma manera son substratos de CDK's, sin embargo, a diferencia de la pRB110, la p107 y p130 actúan también como inhibidores de CDK's (Helt y Galloway, 2003).

Las tres proteínas de la familia Rb (pRB110, p107 y p130) son conocidas como "pocket proteins" debido a que las tres están compuestas de dos dominios conservados (A y B) los cuales están separados por un tercer dominio (C) cuya función es importante para la interacción de la proteína con el factor E2F; A y B juntos constituyen el domino "pocket" importante para la unión con otras proteínas. Los exones que codifican para los tres dominios son muy similares entre los tres genes de la familia sin embargo existe una mayor semejanza entre los genes *RBL1* y *RBL2* que la que existe entre ellos y el gen *RB1*. Las proteínas de la familia RB se encuentran en el núcleo y su localización subnuclear depende de su capacidad de unión a la matriz nuclear (Pier, 2002). Por otro lado, algunos miembros de la familia RB se han encontrado en diferentes especies de animales y plantas, inclusive se ha encontrado una proteína relacionada en el alga *Chlamydomonas*. Los miembros de esta familia al igual que la pRb110 se han encontrado asociados e inactivados por algunas proteínas de origen viral y también se les ha encontrado asociadas a factores de transcripción reprimiendo su función, estas proteínas también pueden formar complejos con ciclinas y kinasas dependientes de ciclinas, así como con deacetilasas de histonas.

Los miembros de la familia RB forman parte de la vía de transducción de señales llamada vía RB, la cual es importante en la regulación del ciclo celular y en procesos como la supresión del crecimiento tisular, diferenciación y apoptosis en diferentes organismos y tipos celulares (Nigg, 2002). Un aspecto muy importante de las proteínas de la familia RB es que aún cuando son enormemente similares en muchas formas, cada miembro de la familia tiene funciones distintas muy específicas sin embargo la pérdida de un miembro de la familia por causa de una mutación puede ser total o parcialmente compensada por algún otro miembro de la familia.

Los tres miembros de la familia RB tienen la capacidad de inhibir el crecimiento celular actuando sobre el ciclo entre las fases G0 y S, principalmente a través de su unión y activación de factores de transcripción. La actividad supresora de la familia RB es específica del tipo celular por ejemplo: la línea celular de carcinoma cervical C33A es inhibida por la sobre-expresión de p107 y p130 pero no por pRb110, mientras que la línea celular de glioblastomas T98G es sensible al efecto supresor de p130 pero no al de pRb110 y p107. Finalmente, las células de osteosarcoma Saos-2 pueden ser inhibidas entre G0/G1 por todos los miembros de la familia RB, estas evidencias, sugieren que existen diferentes vías moleculares por las cuales las proteínas de la familia RB pueden ejercer su control sobre el ciclo celular (Pier, 2002).

### **Asociación de la proteína pRB110 con las oncoproteínas virales E6 y E7 del VPH.**

En líneas de células transformadas o infectadas con VPH o con algún tipo de adenovirus como el SV40, las proteínas virales forman complejos proteicos con la proteína pRB110 (Dyson, 1989). Una vez dentro de la célula huésped, el virus del papiloma humano sintetiza las proteínas E6 y E7, la proteína E7 se une a pRB110 bloqueando su unión al factor E2F el cual, al quedar libre, se une a las regiones promotoras de genes como c-myc, dando lugar a su expresión y por consiguiente a que la célula entre en su ciclo de división celular. Estas evidencias permiten suponer que la unión de estas oncoproteínas con la proteína pRB110 tiene un efecto similar a la pérdida de heterocigocidad (LOH) del gen *RB1* debido a su interacción con

proteínas celulares como pRB110, la oncoproteína viral E7 es considerada un producto oncogénico.

Al analizar la estructura cristalizada de la proteína pRB110 se encontró que puede unirse a un dominio de 9 aminoácidos de la proteína E7 que se caracteriza por el motivo LxCxEx(Lee, 1998), el cual se encuentra también en otras proteínas virales y celulares con capacidad para unirse a pRB110 (González y cols, 2001). En carcinomas escamosos se ha documentado la presencia del genoma de VPH y una ausencia total o una reducción dramática en la cantidad de la proteína pRB (Andi, 1998; Wiest, 2002), lo cual sugiere que el VPH se asocia a la etiología de estos tumores inhibiendo la función normal de la proteína pRB110. Estudios realizados por varios laboratorios indican que la vida media de la proteína pRB110 está reducida en las células transformadas con E7, sugiriendo que la E7 puede entonces inducir la degradación proteolítica de la proteína pRB110, algunos autores (Berezutskaya y cols 1997 a, b; González y cols, 2001) utilizando adenovirus recombinantes que expresan la E7 del VPH16, encontraron que la expresión de E7 conduce a la degradación de la pRB110 a través de la vía del proteosoma 26S y que este fenómeno puede bloquearse si se agregan inhibidores del proteosoma 26S.

### **Participación del VPH en diferentes tipos de Cáncer**

El VPH frecuentemente se asocia con lesiones epiteliales proliferativas y benignas; en algunos casos estos virus están asociados con lesiones que pueden progresar a carcinomas y ciertos tipos de VPH están más asociados al cáncer cervical (Dyson y cols, 1989).

El VPH pertenece al grupo de virus oncolíticos junto con otros adenovirus (Bell, 2002). Desde 1907 (Charles, 1987), se sabe que el VPH es un factor causante de verrugas genitales en humanos y existen datos de los últimos cien años donde se reporta la transformación maligna de esas verrugas (*Condylomata acuminata*) generalmente asociadas con los VPH's del tipo 6 y 11, después de una larga duración y resistencia a la terapia aplicada a los pacientes.

La mayoría de los más de 100 tipos de VPH conocidos se pueden clasificar en tres diferentes grupos: **1)** Aquellos que causan verrugas en piel no genital en la población general, **2)** Aquellos que inducen verrugas en pacientes con epidermodisplasia verruciformis (EV) y **3)** Aquellos que inducen lesiones en piel genital o membranas mucoides; los del primer grupo se presentan en la población general y no tienen potencial maligno, incluyen verrugas en manos y pies usualmente debidas a VPH1, VPH2 y VPH4, y las verrugas planas que generalmente involucran cara y extremidades se asocian al tipo VPH3; los VPH del segundo grupo se encuentran generalmente en pacientes con epidermodisplasia verruciformis, aunque ésta es una condición rara, cerca de la mitad de los más de 100 tipos de VPH identificados se han encontrado en lesiones de pacientes con EV. Los del tercer grupo usualmente se encuentran en lesiones malignas de la membrana mucoide como vagina, cérvix, uretra, ano, boca, laringe y piel genital, estos incluyen a los VPH del tipo 6, 11, 16, 18, 31 y 33, y usualmente se dispersan por transmisión sexual (Lowy; 1989, Vousden, 1994; Harald 1996; Munger, 2002; Proemoli, 2005).

Los papilomas de la laringe usualmente son causados por VPH6 o VPH11, aproximadamente la mitad de los papilomas de laringe ocurren en niños y muchas de las madres de estos niños tienen evidencia de infección con VPH. La transmisión del virus puede darse durante el trabajo de parto, como lo indican estudios por técnicas de hibridación molecular convencional (Lowy, 1989). Estos estudios han revelado que una alta proporción de mujeres sexualmente activas están infectadas con el virus papiloma humano: del 10 al 20% de mujeres no embarazadas a más del 30% de mujeres embarazadas; el alto porcentaje de resultados positivos observados en mujeres embarazadas se ha atribuido a una relativa inmunosupresión asociada al embarazo, lo cual implica que una significativa proporción de mujeres no embarazadas con resultado negativo pueden portar el virus en forma latente sin que pueda ser detectado por las técnicas moleculares.

La proporción de hombres asintomáticos ha recibido menos atención, pero el VPH se ha detectado en cerca del 5 % de las biopsias de uretra de hombres asintomáticos (Lowy, 1989). Actualmente se desconoce la historia natural de las infecciones



asintomáticas en hombres y mujeres pero la extraordinaria prevalencia indica que la mayor parte de las infecciones no están destinadas a causar lesiones clínicas serias.

### **El papel del VPH en el carcinoma de cérvix**

El carcinoma de cérvix es una de las neoplasias más comunes en las mujeres, en los países desarrollados se reportan alrededor de 15,000 casos nuevos por año y México ocupa el primer lugar de las neoplasias en mujeres, de las cuales la tercera parte generalmente mueren durante los 5 años posteriores al diagnóstico.

De acuerdo con Lowy y ZurHausen (Lowy,1989, ZurHausen, 2009) el 90% de los casos con carcinoma cervical (primario y metastásico) contienen DNA del VPH, siendo el 16 el más frecuente y en menor proporción el 18, 31 y 33. Aunque los del tipo 6 y 11 son comunes en lesiones cervicales no malignas, raramente se les encuentra en los carcinomas cervicales, además estos dos tipos de papilomas son por mucho los más frecuentemente encontrados en verrugas de la piel anogenital y frecuentemente se consideran benignos, también se les ha encontrado en otros tipos de tumores del epitelio genital.

Desde hace más de un siglo, al cáncer cervical se le ha identificado como una enfermedad que se puede transmitir sexualmente y actualmente se sabe que el VPH de alto riesgo está involucrado en la génesis de diferentes tipos de cáncer de los cuales más del 90% corresponde a casos con cáncer cervical y lesiones pre-malignas. Actualmente el VPH16 produce neoplasias con un potencial altamente maligno pero de acuerdo con Vousden y Farrel (1994) no todos los casos infectados con VPH de alto riesgo desarrollan cáncer. Cualquiera que sea la causa, la complicada interrelación de los factores genéticos y epigenéticos que gobiernan la regresión o la progresión de las lesiones inducidas por el VPH aún es poco conocida, pero es muy probable que el estado inmunológico y hormonal sea un factor determinante en la culminación de la infección.

## **Características estructurales y funcionales del VPH**

### **Estructura del virión**

El virión de VPH consiste de una sola molécula de DNA circular de doble cadena de aproximadamente 8000 pb, está contenido dentro de una cápside de 72 capsómeros dispuestos en una estructura icosaédrica. La partícula viral tiene una densidad en cloruro de cesio de 1.34 g/ml. Las unidades virales tienen entre 52 y 55 nm de diámetro (Figura 9). La cápside consiste de al menos dos proteínas estructurales, la más grande tiene un peso molecular de aproximadamente 55,000 daltons y representa el 80% del peso total de las proteínas virales, la segunda proteína tiene un peso molecular de aproximadamente 70,000 daltons, ambas proteínas son codificadas por dos marcos de lectura en el genoma viral L1 y L2 (Howley, 1991).

En general el genoma de los VPH se divide en tres regiones:

- 1.- LCR :** Región reguladora (del ingles: "Long Control Region") que cubre el 10 % del genoma.
- 2.- L :** Región de replicación tardía (del ingles: "Late") codifica para proteínas estructurales.
- 3.- E :** Región de replicación temprana (del ingles: "Early"). Codifican para proteínas reguladoras implicadas en la persistencia del genoma, replicación del DNA viral y activación del ciclo lítico. Esta región se divide a su vez en los siguientes grupos (Vousden, 1994; Harald, 1996; Munger, 1995) cada una con una función específica:

**E 1:** Codifica para un RNA policistrónico, tiene capacidad de unión sitio específica para el DNA e hidroliza al ATP, es esencial para la replicación del genoma viral y representa la estructura más conservada entre los diferentes tipos de papilomavirus.

**E 2:** Codifica para dos y probablemente tres proteínas diferentes que actúan como factores de transcripción y representan los principales reguladores intragenómicos.

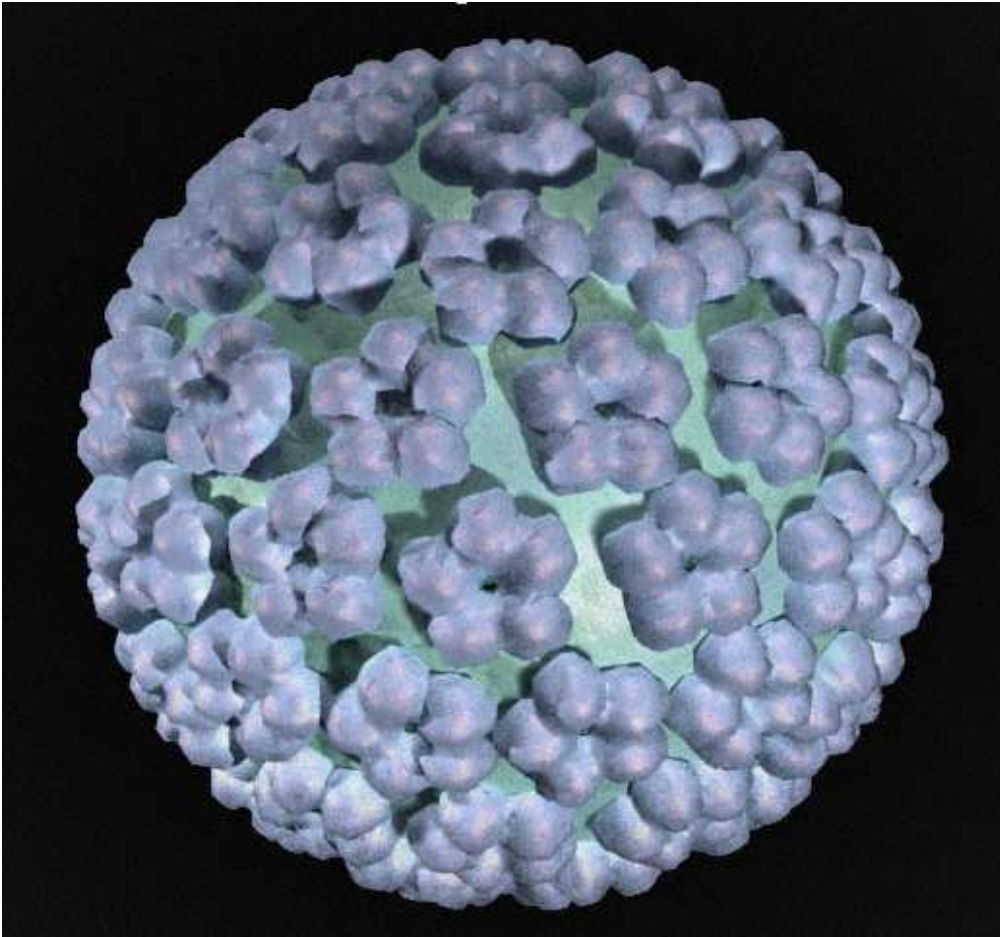
**E 4:** Su RNAm es el principal transcrito encontrado en las lesiones inducidas por HPV, aún no se conoce su papel en el ciclo de vida del virus, pero su proteína se asocia con las queratinas del citoesqueleto de células cultivadas.

**E 5:** Codifica para pequeñas proteínas hidrofóbicas que se encuentran predominantemente en las membranas celulares, incrementa la sensibilidad de las células a factores de crecimiento endógeno.

**E 6:** Representa un oncogén independiente, pues su producto puede immortalizar células mamarias epiteliales en humanos, coopera con el oncogén ras en la immortalización de células primarias de roedor, además, puede interactuar con p53 y mandarla a degradación por la vía proteolítica causando inestabilidad genómica.

**E 7:** Codifica para una proteína que tiene la capacidad de unirse a la proteína pRB110 e inhibirla *in vitro*, la afinidad entre la E7 de los VPH de alto riesgo y pRB110 es 10 veces mayor que la E7 de los VPH de bajo riesgo.

Recientes estudios de cultivo de tejidos indican que la expresión continua de los oncogenes virales E6 y E7 es una condición necesaria para mantener el fenotipo transformado en los tejidos infectados con los VPH de alto riesgo. Todos los papilomavirus muestran la misma organización genómica básica y expresan proteínas similares (Vousden, 1994).



Tomado de: [www.med\\_ars.it/galleries/virus\\_9.htm](http://www.med_ars.it/galleries/virus_9.htm).

Figura 9.- **MODELO TRIDIMENSIONAL DEL VPH.** Los papiloma virus pertenecen a los DNA virus, con forma hicosaédrica y no envueltos; se replican en el núcleo de las células epiteliales utilizando la maquinaria de transcripción de la célula huésped. Históricamente, los VPH han sido agrupados junto con los poliomasvirus para formar la familia Papovaviridae, término que deriva de las dos primeras letras de los virus “rabbit papilomavirus”, “mouse polyomavirus” y “simian vacuolating”. Los papilomavirus y poliomasvirus pueden ser distinguidos fácilmente por el tamaño de los viriones (55 nm y 40 nm) y su genoma de 8 pb y 5 pb respectivamente (Álvarez, 1995).

### **Antecedentes clínicos de asociación del VPH con el Retinoblastoma**

La incidencia del RB es mayor en los países en desarrollo que en los países desarrollados (Stiller y Parking, 1996) y aunque aún no se conoce con certeza, ésta diferencia se ha relacionado con factores ambientales, culturales y socio-económicos, uno de los factores propuestos como implicados en la tumorigénesis es la infección viral.

Por otra parte existen evidencias de que en los países como México, donde la incidencia del cáncer cérvico uterino es alta, la frecuencia de RB es mayor. La infección por VPH en mujeres, es sin duda uno de los problemas más importantes de salud en los países en desarrollo, por su implicación en la oncogénesis y por el riesgo de ser transmitido a la descendencia a través del canal de parto. Actualmente, existen reportes donde se ha asociado al virus papiloma con la etiología del retinoblastoma. De hecho en uno de ellos realizado por Orjuela y cols en pacientes mexicanos con RB esporádico del Instituto Nacional de Pediatría (INP), se detectó la presencia del VPH en el 33 % de los tejidos tumorales estudiados (Orjuela, 2000) y en otro se detectó la presencia del VPH en el 27.9% (Palazzi, 2003) sin embargo estos hallazgos son controversiales.

Por otro lado, en un estudio previo realizado en pacientes del INP se encontró que el 71% de los casos son unilaterales, y de estos el 47% desarrolló el tumor antes del año de edad y aún más, dentro de este grupo el 54% presentó el tumor antes de los seis meses de edad. Estas observaciones difieren con el esperado 10-15 % de los pacientes con RB unilateral que se manifiestan antes del año de edad y sugieren que en la población mexicana la forma unilateral es más frecuente (Diaz M, 1992) o que existen otros mecanismos implicados en la oncogénesis del RB como la infección por VPH.

## **JUSTIFICACIÓN**

De acuerdo con la literatura, el tumor tanto en su forma hereditaria como no hereditaria se desarrolla por la inactivación del gen *RB1*, fenómeno causado frecuentemente por mutaciones de tipo puntual. Sin embargo, existe una proporción de casos con retinoblastoma (20 %) en los que no se han encontrado mutaciones en el gen *RB1* (Gallie 1999, Alonso 2001 y Valverde 2005).

Además en investigaciones previas se ha encontrado que los casos con retinoblastoma unilateral son más frecuentes en nuestra población que lo reportado en la literatura para otras poblaciones y según Orjuela el 33% de los pacientes con retinoblastoma esporádico son positivos al VPH; además, aunado a las evidencias de que en los países como México, donde la incidencia del cáncer cervico uterino es alta, la frecuencia de RB es mayor, estas evidencias nos conducen a suponer que el VPH de alto riesgo juega un papel preponderante en la oncogénesis del retinoblastoma.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar cuales son los mecanismos de oncogenesis del Retinoblastoma en pacientes del Instituto Nacional de Pediatría.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1.- Caracterizar las mutaciones en el gen *RB1* en una muestra de pacientes con RB.
- 2.- Contribuir al diagnóstico diferencial entre la forma unilateral hereditaria y no hereditaria.
- 3.- Detectar y tipificar los tipos de VPH asociados con tumores de retinoblastoma.
- 4.- Correlacionar el mecanismo de oncogénesis del RB con la edad de inicio y la forma de presentación del tumor (mutaciones en el gen *RB1* o infección con VPH).
- 5.- Determinar si la alta frecuencia de RB unilateral que se manifiesta antes del año de edad en la población mexicana (57 %), es debida a la infección por VPH o a una elevada frecuencia del RB hereditario.
- 6.- Conocer si la frecuencia de mutaciones en el gen *RB1* correlaciona con la expresión del gen.

## **DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **Clasificación del estudio**

Transversal, observacional y descriptivo

### **Criterios inclusión**

Se incluyeron en el estudio pacientes que acudieron al Instituto Nacional de Pediatría en el periodo de 2001 al 2003 cuyo diagnóstico clínico e histopatológico fue retinoblastoma y de los cuales se contaba con muestra del tumor y con la carta de consentimiento informado.

### **Criterios de exclusión**

Se excluyeron aquellos pacientes que fueron transfundidos o sometidos a quimioterapia y/o radioterapia en los últimos tres meses anteriores al estudio.

## **ESTRATEGIA**

La estrategia de este trabajo se compone de dos etapas a continuación se describe cada una de ellas:

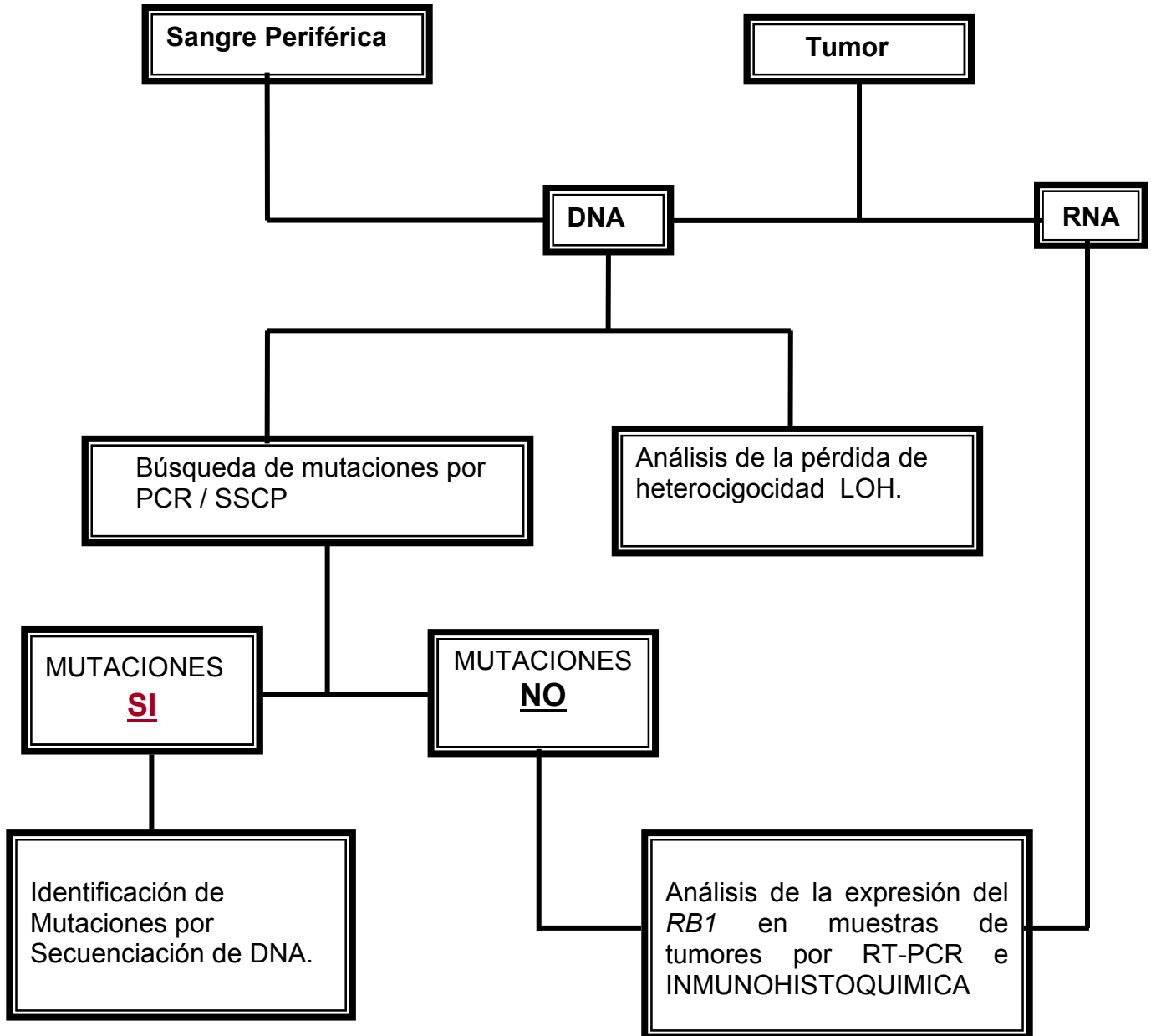
**PRIMERA ETAPA**  
**Búsqueda de mutaciones en el gen *RB1***  
(Ver diagrama de flujo 1)

Consistió en : a) Detectar y caracterizar mutaciones en los 27 exones del gen *RB1* incluyendo la región del promotor y b) analizar la pérdida de heterocigocidad (LOH) en cada paciente. Para ello, a cada individuo se le tomaron 7 ml de sangre periférica usando EDTA como anticoagulante y se obtuvo tejido tumoral en el momento de la cirugía (Enucleación). El DNA se purificó siguiendo el procedimiento de kits comerciales. Una vez obtenido el DNA se procedió a amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) los 27 exones incluyendo la región promotora del gen *RB1* y después se realizó un reamplificado marcado radioactivamente para poder realizar el análisis del polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) de cada uno. Para ello, los amplificados de PCR marcados radioactivamente con  $\alpha$ -<sup>32</sup>PdCTP, se desnaturalizaron a 94 °C y se corrieron en un gel de acrilamida no desnaturalizante, que contenía glicerol como estabilizador de las estructuras secundarias. Para la reacción de PCR se utilizaron los oligonucleótidos diseñados por Blanquet y cols (1994). Los patrones de electroforesis alterados fueron sugestivos de la presencia de una mutación las cuales fueron posteriormenmte caracterizadas por secuenciación tipo Sanger (Sanger, 1977) en un secuenciador automatizado ABI PRISM 3130 y el programa Sequencing Analysis Software v 5.3.1.

Por otra parte para analizar la pérdida de heterocigocidad, se analizaron dos sitios intragénicos, (*fragmentos de restricción de longitud polimórfica; RFLP's*) ***Xba I*** sobre el intron 17 y ***Bam HI*** sobre el intron 1 (Wiggs et al. 1988; Onadim y Cowell, 1991). Cada polimorfismo fue considerado como informativo cuando se encontró de manera heterocigota en el DNA de los leucocitos del caso índice, y las muestras tumorales se consideraron positivas a la pérdida de heterocigocidad si uno de los dos alelos presentes en el DNA de los leucocitos estaba ausente en el DNA del tejido tumoral del mismo paciente (Kato et al, 1993). En aquellos casos donde no se detectaron mutaciones las muestras fueron analizadas para analizar la expresión del gen *RB1* mediante la detección del RNAm (empleando Dietilpirocarbonato durante todo el proceso) y de la proteína pRB110 por RT-PCR e Inmunohistoquímica.



Búsqueda de mutaciones en el gen *RB1*



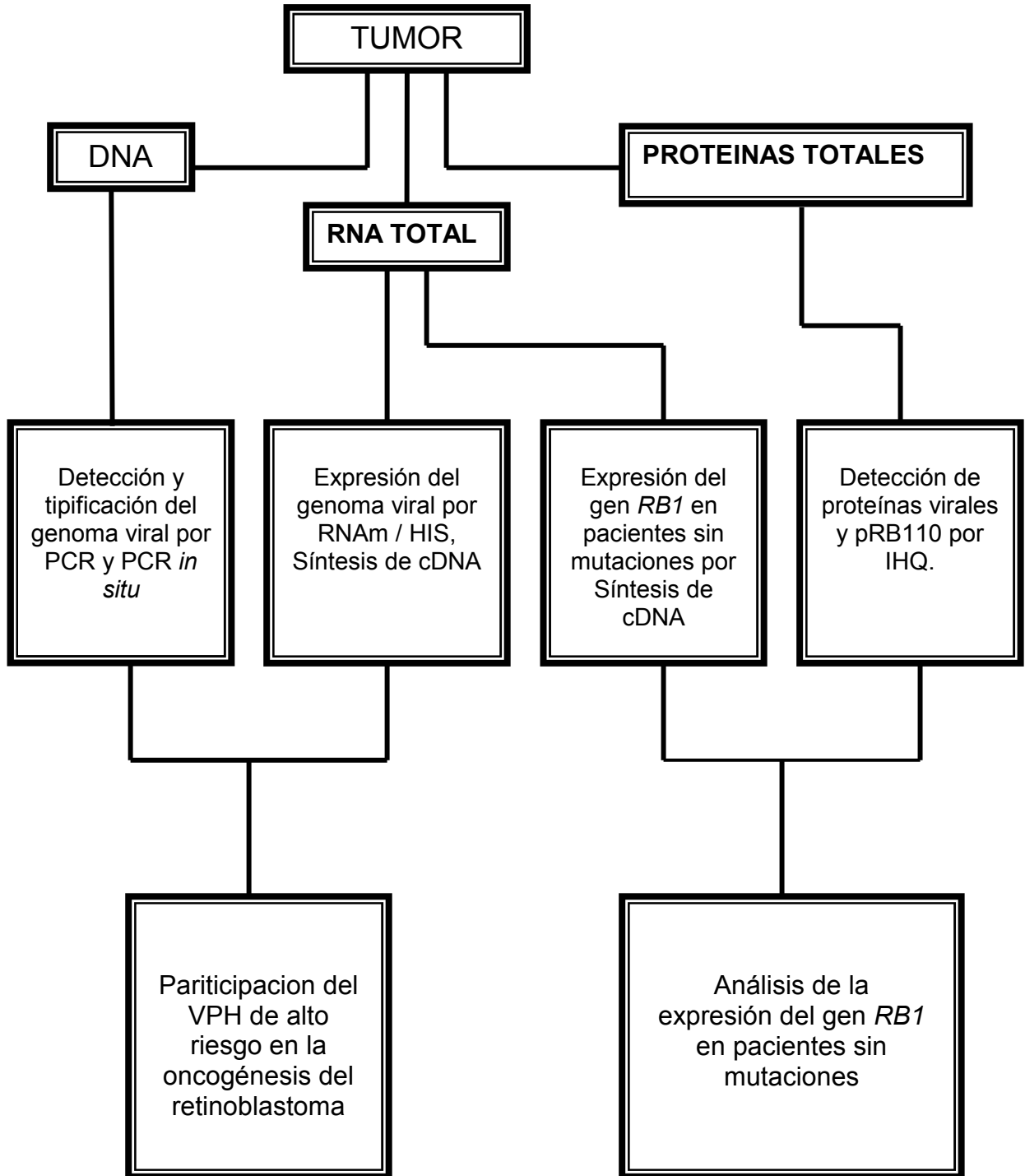
**SEGUNDA ETAPA**  
**Análisis de la participación del VPH**  
*(Ver diagrama de flujo 2)*

**Detección del genoma viral VPH 16/18**

Para determinar la participación del VPH la estrategia planteada fue la búsqueda de VPH en las muestras tumorales mediante PCR, para lo cual se tomó una muestra de tejido tumoral de cada paciente enucleado y se dividió en dos secciones una de las cuales se incluyó en etanol al 70% y la otra se incluyó en parafina la cual a su vez se dividió en 2 partes, una para el estudio histopatológico y otra para el estudio molecular.

Para la búsqueda del genoma viral mediante PCR se utilizaron oligonucleótidos específicos para una región altamente conservada entre un alto número de tipos de VPH. Como controles positivos se incluyeron las líneas celulares HeLa y Caski. Para la tipificación de los tipos de VPH presentes se utilizaron oligonucleótidos específicos para los tipos 16 y 18 diseñados por Manos (1989). Posteriormente se determinó la expresión de los genes *RB1* y E6/E7 del VPH en tejido tumoral mediante Hibridación “*in situ*” para detectar el RNAm correspondiente a los genes *RB1* y E6/E7 del VPH por utilizando sondas específicas para cada RNAm e Inmunohistoquímica para detectar la presencia de las proteínas codificadas por los genes *RB1* y E6/E7 del VPH.

Análisis de la participación del VPH



## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **I.- Obtención de muestras biológicas.**

Los tejidos fueron obtenidos de:

- a) sangre periférica de 48 pacientes y sus familiares de primer grado
- b) 68 muestras tumorales embebidas en parafina y en etanol al 70%.
- c) líneas celulares HeLa y CasKi

### **II.- Recopilación de muestras de DNA**

Se creó un banco de 48 muestras de DNA de pacientes más la de los familiares de primer grado. En todos los casos la concentración promedio de DNA fue de 1µg/µl y la integridad fue valorada en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (ANEXO I).

### **III.- Búsqueda de mutaciones en el gen *RB1***

#### **Amplificación por PCR y análisis del polimorfismo conformacional de cadenas sencillas de DNA (SSCP).**

Se utilizaron los oligonucleótidos necesarios para la amplificación de los 27 exones y la secuencia promotora del gen *RB1*. Los oligonucleótidos utilizados para la PCR fueron diseñados de acuerdo con las secuencias de las cadenas sencillas que flanquean los extremos de los exones del gen *RB1* por lo que con ellos se puede analizar tanto los sitios de unión intrón-exón como toda la secuencia codificadora de cada uno de los exones (Blanquet, 1993, Blanquet, 1995). El proceso de amplificación se llevó a cabo con la mezcla de reacción de 25 ul como se indica en el CUADRO 1 y se utilizó un termociclador 9100 de Applied Biosystems bajo el siguiente protocolo:

	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
a)	94 ° C	2 minutos	1
a)	94 ° C	20 segundos	30
b)	55 ° C	20 segundos	
c)	72 ° C	30 segundos	
a)	94 ° C	12 segundos	1
b)	65 ° C	20 segundos	
c)	72 ° C	7 minutos	
d)	4 ° C	∞	

CUADRO 1.- **CONDICIONES PARA LA MEZCLA DE REACCIÓN DE PCR**

REACTIVO	VOLUMEN		STOCK	
H <sub>2</sub> O	cbp	25	μl	
Buffer taq	2.70		μl	10 X
ATGC	0.55		μl	10 mM
Oligonucleótido F	0.89		μl	100 ng/μl
Oligonucleótido R	0.89		μl	100 ng/μl
Taq Polimerasa	1.00		μl	10 U/μl
Mg Cl <sub>2</sub>	4.00		μl	25 mM
DNA	100.00		ng/μl	
Volumen de reacción	25.00		μl	

Debido a las características fisicoquímicas de la secuencia del promotor del gen *RB1*, se requirió de un programa de amplificación diferente, las condiciones de termociclado utilizadas para este proceso son las siguientes:

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
a)	94 ° C	2 minutos	1
a)	94 ° C	40 segundos	35
b)	52 ° C	1 minutos	
c)	72 ° C	1 minutos	
a)	94 ° C	12 segundos	1
b)	65 ° C	20 segundos	
c)	72 ° C	7 minutos	
d)	4 ° C	∞	

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

Después de concluida la amplificación, ésta se verificó colocando 1µl de amplificado en un gel de agarosa al 2.5 % con bromuro de etidio y se sometió a electroforesis a 85 V durante 1 h. Posteriormente se observó el DNA en un transiluminador de luz U. V. sobre el cual se tomó la fotografía correspondiente.

### **Análisis del polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP).**

Para detectar las mutaciones por SSCP, los amplificados obtenidos se reamplificaron nuevamente con el mismo programa de PCR. Las condiciones de reacción se llevaron a cabo ésta vez en un volumen de 10 ul y en presencia de fósforo radioactivo ( $\alpha$ -<sup>32</sup>PdCTP) como se indica en el CUADRO 2. Posteriormente los amplificados obtenidos en ésta reacción se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizante.

CUADRO 2.- **CONDICIONES PARA LA REACCIÓN DE SSCP**

<b>REACTIVO</b>	<b>VOLUMEN</b>		<b>STOCK</b>	
H <sub>2</sub> O	cbp	10.00 µl		
Buffer	1.00	µl	10	X
ATGC	0.40	µl	10	mM
Oligonucleótido R	0.50	µl	100	ng/µl
Oligonucleótido F	0.50	µl	100	ng/µl
Taq Polimerasa	1.00	µl	10	U/µl
Mg Cl <sub>2</sub>	1.50	µl	25	mM
$\alpha$ - <sup>32</sup> PdCTP	0.10	µl	2	Mm
DNA amplificado	1.00	µl	100	ng/µl
Volumen final de reacción	10.0	µl		

### **Electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturizante**

Una vez concluida la PCR en presencia de  $\alpha$ -<sup>32</sup>PdCTP, se mezcló 1.5  $\mu$ l del amplificado con 9 $\mu$ l de colorante xilen-cianol y azul de bromo fenol y se incubó por 10 minutos a 95 °C para desnaturizar el DNA. Inmediatamente después se colocó la mezcla en hielo por 5 minutos y finalmente se colocaron 3 $\mu$ l de cada muestra en un gel de poliacrilamida por 19 h a 150 V en buffer TBE 1 X.

### **Autorradiografía**

Después de transcurrido este tiempo se colocó el gel en papel filtro y se cubrió con una película de Egapack, se secó a 80 °C en un sistema de vacío por 1 h y se montó en un cassette de foto-exposición con dos placas Kodak O-matic. Las placas se revelaron en tiempos de 12 y 24 horas para poder ver la señal radioactiva que quedó impresa en las autorradiografías. Todos los individuos que NO tienen una mutación en la misma región del genoma comparten el mismo patrón electroforético y a la vez cada región del genoma humano tiene un patrón electroforético único, estas características del genoma permiten detectar a aquellos individuos portadores de alguna mutación.

### **Secuenciación**

Se secuenciaron las muestras informativas que mostraron patrones electroforéticos anormales por PCR/SSCP con la finalidad de caracterizar los polimorfismos presentes o las mutaciones asociadas al desarrollo del tumor. Las secuencias obtenidas experimentalmente se compararon con la secuencia del gen *RB1* registrada en BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSIÓN 2.2.2. ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)); las secuencias generadas fueron comparadas con los datos del gen *RB1* de tipo silvestre registrados en el Gene Bank con número de acceso 11910. Para secuenciar el DNA fue necesario primero purificar los productos de PCR antes de someterlos a la reacción de secuenciación con el fin de evitar la presencia de contaminantes que pueden inhibir la acción de los reactivos implicados en el procedimiento y eliminar subproductos generados en la PCR que pudiesen alterar la secuencia del DNA que se quiere analizar (ANEXO II).

#### **IV Análisis de Pérdida de Heterocigocidad (LOH) por RFLP's (*fragmentos de restricción de longitud polimórfica*)**

Para analizar la pérdida de heterocigocidad, se utilizaron dos polimorfismos intragénicos, **Xba I** sobre el intrón 17 y **Bam H I** sobre el intrón 1 (Wiggs et al. 1988; Onadim y Cowell, 1991). Los intrones 1 y 17 del gen *RB1* fueron amplificados por PCR de acuerdo al protocolo de Bookstein et al (1988) y McGee et al (1990) respectivamente. Los productos amplificados fueron digeridos con las enzimas de restricción **Bam H I** para el intrón 1 y **Xba I** para el intrón 17 de acuerdo a los procedimientos descritos por el proveedor. Los fragmentos de DNA obtenidos en la digestión enzimática se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%. Cada polimorfismo fue considerado como informativo cuando se encontraba heterocigoto en el DNA de los leucocitos del caso índice, y las muestras tumorales se consideraron positivas a la pérdida de heterocigocidad cuando uno de los dos alelos presentes en el DNA de los leucocitos estaba ausente en el DNA del tejido tumoral del mismo paciente (Kato et al, 1993).

#### **V Detección del VPH por amplificación del genoma viral**

Este procedimiento se llevó a cabo con un grupo de 66 tumores incluidos en alcohol al 75% y embebidos en parafina. La PCR ha demostrado ser el método más sensible para la identificación de infecciones por VPH en muestras clínicas, permite la detección de un amplio espectro de tipos de VPH y su sensibilidad es de menos de 10 hasta 100 copias del genoma viral por célula. A las muestras de tejido tumoral se les realizó un tamiz por PCR para detectar el DNA viral, se utilizaron los oligonucleótidos universales para la región conservada L1 y la región E6/7 de los VPHs de alto riesgo 16 y 18 (Manos M, 1989; Yoshikawa, 1990; Karlsen, 1996; Berumen, 1994):



**Oligonucleótidos utilizados en el análisis del VPH:**

<b>Nombre del OLIGO</b>	<b>AMPLICÓN</b>	<b>TAMAÑO (pb)</b>
$\beta$ -Actina	El gen de la $\beta$ -Actina	200
$\beta$ -Globina	El gen $\beta$ -Globina	268
MY09/MY11	Secuencia VPH altamente conservada	456
L1C1/LIC2	Región L1	260
GP5+/GP6+	Región L1	150
E6C1/E6C2	Región E6 en VPH	300
16E6/72	Región específica para VPH 16	300
18E6/72	Región específica para VPH 18	290

En esta etapa, las líneas celulares HeLa y CasKi que derivan de muestras de Cáncer cérvico uterino positivos para VPH 18 y VPH 16 respectivamente, fueron utilizadas como controles de referencia. Para amplificar el genoma viral se probaron diferentes condiciones de reacción resultando ser la óptima la que se muestra en el CUADRO 3, y el protocolo de termociclado óptimo fue el siguiente:

<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
a) 94 ° C	2 minutos	1
a) 94 ° C	20 segundos	30
b) 55 ° C	20 segundos	
c) 72 ° C	30 segundos	
a) 94 ° C	12 segundos	1
b) 65 ° C	20 segundos	
c) 72 ° C	7 minutos	
d) 4 ° C	$\infty$	

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

CUADRO 3 .- **CONDICIONES DE REACCION PARA DETECCIÓN DEL DNA VIRAL**

<b>REACTIVO</b>	<b>VOLUMEN</b>	<b>STOCK</b>
H <sub>2</sub> O	11.00 µl	
Buffer taq. Pol.	1.45 µl	10 X
dNTP's	0.33 µl	10 mM
Oligonucleótido R	0.33 µl	100 ng/µl
Oligonucleótido F	0.33 µL	100 ng/µl
Taq Polimerasa	0.33 µl	10 U/µl
Mg Cl <sub>2</sub>	1.16 µl	25 mM
DNA	1.00 µl	1.00 ng/µl
Volumen de reacción	15.0 µl	

### **VI Detección del VPH por amplificación *in situ* del genoma viral**

Para descartar la posibilidad de que el DNA se dañe al momento de ser extraído de los tejidos en parafina, se realizó el tamiz por reacción en cadena de la polimerasa *in situ* (PCR *in situ*) de los tejidos tumorales con las siguientes condiciones:

#### **Desparafinación de los tejidos embebidos en parafina**

Se incubaron las laminillas a 65 ° C toda la noche,

Posteriormente se incubaron en presencia de xileno durante 2 h.

Se colocaron en etanol absoluto dos veces por 15 minutos cada una y

***M en BE Miguel Macías Vega***

Se enjuagaron en agua destilada un minuto y 10 minutos en HCl 0.02 N, 2 minutos en PBS 1X y 3 minutos en una solución de PBS 1X-Triton X100 (0.01 %), seguido de 2 minutos en PBS 1X

Después las laminillas se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente con proteinasa K (0.5 µg/ml) y 7 minutos en glicerol al 2 %, seguido de 3 minutos en PBS y 10 minutos en una solución de anhídrido acético 0.25 % + 0.1 M de trietanolamina. Después se colocaron en ácido acético al 20 % durante 15 segundos y se enjuagaron en agua bi-distilada por 2 minutos y finalmente se enjuagaron en etanol absoluto por 1 minuto y se secaron al aire libre.

***PCR in situ***

Se utilizaron los oligonucleótidos y los programas de termociclado mencionados arriba, las concentraciones de los reactivos fueron las mismas que se mencionan en el CUADRO 3 con la característica de que los nucleótidos utilizados en este procedimiento están marcados con digoxigenina para ser detectadas con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina. El revelado se llevó a cabo con NBT/BCPT. En este paso se utilizaron como controles positivos para VPH muestras de tejido carcinomas invasivos y de cérvix positivas por inmunohistoquímica y PCR para VPH de alto riesgo.

**VII EXPRESIÓN DE pRB110, E6/E7 POR HIBRIDACIÓN *IN SITU***

Para analizar la expresión del genoma viral se sintetizaron las sondas de RNAm que permitieran analizar el RNAm de la proteína pRB y E6/E7 del VPH de alto riesgo por transcripción *in situ* ANEXO III.

**VIII Detección por Inmunohistoquímica de las proteínas pRB110, E6/E7.**

**Fijación:**

El tejido ocular se fijó con formaldehído amortiguado al 10% por 24 hrs.

Se realizó la deshidratación en un Histoquinet automático. La inclusión se realizó en parafina a 60 °C, posteriormente se realizaron cortes a 3 micras de grosor sobre una laminilla preparada con poli-l-lisina al 10%.

### **Hidratación**

Los cortes se calentaron durante toda la noche a 60 °C, posteriormente se realizó la desparafinación en un tren de deshidratación de la siguiente manera:

Xilol 100% por 5 min 2 veces.

Lavar 2 veces en Alcohol absoluto por 30 seg.

Lavar 2 veces en Alcohol al 96% por 30 seg.

Lavar 2 veces en Alcohol al 70% por 30 seg.

Lavar 2 veces en Alcohol al 50% por 30 seg.

Lavar 2 veces en agua destilada por 30 seg.

Una vez tratadas las laminillas se procedió a realizar la prueba de Inmunohistoquímica iniciando con la recuperación de antígenos de acuerdo con el ANEXO IV

## **IX WESTERN BLOT DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN EL DESARROLLO DEL RETINOBLASTOMA pRB110, pRB106, Ciclina E, Cdk2, p21.**

### **Anticuerpos utilizados**

Anti-ciclina E policlonal

Anti-Cdk2 policlonal

Anti-RB 110 monoclonal

Anti-RB106 policlonal

Anti-p21 monoclonal

### **Lisado de tejido tumoral**

Se lisaron 100 µg de tejido tumoral en presencia de 1.0 ml de buffer RIPA, y después se centrifugó la muestra a 15000g a 4 °C durante 20 minutos; se separó el sobrenadante y se mezcló con acarreador que contenía SDS 2% para proteínas en la siguiente proporción:

*M en BE Miguel Macías Vega*

66  $\mu$ l de acarreador

434  $\mu$ l de sobrenadante

La mezcla se hirvió durante 5' y después se cargó en el gel para separar por electroforesis las proteínas del tejido.

**Electroforesis para separación de proteínas**

Preparación del gel de bisacrilamida al 15%, para la electroforesis se mezclaron los siguientes reactivos:

Acrilamida 30% / bisacrilamida 0.8%	7.50 ml
Tris.Cl / SDS pH 8.8 (4X)	3.75 ml
H <sub>2</sub> O	3.05 ml
Persulfato de amonio al 10%	250 $\mu$ l
TEMED	50.0 $\mu$ l

Se cargó en la cámara de electroforesis hasta una altura de 11 cm, una vez polimerizado se cubrió con alcohol isobutílico y se permitió que ocurriera la polimerización por 30' a temperatura ambiente. Posteriormente se retiró el alcohol y se cargó el gel de estacado para separar las proteínas con la siguiente composición:

Acrilamida 30% / bisacrilamida 0.8%	0.65 ml
Tris.Cl / SDS pH 8.8 (4X)	1.25 ml
H <sub>2</sub> O	3.05 ml
Persulfato de amonio al 10%	25.0 $\mu$ l
TEMED	5.0 $\mu$ l

Se mezclaron y se colocaron en la cámara de electroforesis, se colocó el peine y se permitió que ocurriera la polimerización durante 30 minutos a temperatura ambiente, el corrimiento se realizó con buffer TBE 1X.

### **Carga de las muestras para corrimiento**

Se incubaron a 93 °C 100 µl de lisado durante 5 minutos y se mezclaron con 50 µl de acarreador para proteínas, se cargaron las muestras en el gel y se corrieron a 14 V hasta que el azul de bromofenol alcanzó el fondo del gen.

### **Detección de proteínas por Western Blot**

Posteriormente se retiró el gel de la cámara de electroforesis y se agitó en buffer de transferencia por 10 minutos, se colocó en la cámara de electrotransferencia toda la noche, después se separó la membrana de nitrocelulosa, se colocó en solución de bloqueo y se incubó toda la noche a 4 °C, a continuación se lavó la membrana 3 veces con solución de lavado y se incubó con el anticuerpo correspondiente en la solución de bloqueo por 1h a temperatura ambiente. Después se incubó la membrana en presencia del anticuerpo secundario (1:3000) por 1h a temperatura ambiente, a continuación, se lavó la membrana una vez en PBS 1X y finalmente se reveló el resultado con NBT/BCIP.

### **X ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL GEN *RB1* EN MUESTRAS DE TUMORES**

De acuerdo con el Diagrama de flujo 1, las muestras en las que no se detectaron mutaciones fueron analizadas para buscar la expresión del gen *RB1* sintetizando el cDNA por dos procedimientos, transcripción reversa (RT-PCR) *in situ* e *in vitro* de acuerdo con los procedimientos indicados en el ANEXO V.

## RESULTADOS

Se estudiaron en total 48 pacientes pediátricos no relacionados entre sí, con diagnóstico de retinoblastoma; de ellos el 43.8% (n = 21) presentó la forma bilateral y el 56.2% (n= 27) la forma unilateral. La edad promedio de inicio de la enfermedad fue de 5 meses entre los casos con retinoblastoma bilateral (ANEXO VI). En contraste a lo esperado, el 51.8% (14/27) de los casos con la forma unilateral desarrollaron el tumor antes del primer año de edad y diez de ellos (71.4%) fueron diagnosticados antes de los seis meses de edad (CUADRO 4). Sólo un paciente con la forma unilateral y dos con la forma bilateral refirieron antecedentes familiares de la enfermedad.

En todos los pacientes fue necesaria la enucleación de por lo menos un ojo debido al grado de desarrollo del tumor al momento del diagnóstico. El principal motivo de la consulta fue la leucocoria en el 95% de los casos y estrabismo en un 5%.

CUADRO 4.- Edad de inicio del padecimiento en los pacientes incluidos en este estudio.

EDAD DE INICIO	RB UNILATERAL (n)	%	RB BILATERAL (n)	%
0 – 6 m	8	28.50	21	66.00
7 – 12 m	8	28.50	6	18.00
13 m – 5 a	12	43.00	5	16.00
> 5 a	0	0.00	0	0.00
<b>TOTAL</b>	<b>28</b>	<b>100</b>	<b>32</b>	<b>100</b>

m= meses, a= años

### Patrones electroforéticos anormales detectados por PCR/ SSCP.

El análisis del polimorfismo conformacional de cadenas sencillas de DNA acoplada a la secuenciación, permitió detectar mutaciones en el 29.2% de los pacientes. Dado que el RB es un trastorno autosómico dominante, las muestras de los padres se analizaron dirigidamente para determinar si tales alteraciones fueron heredadas o son mutaciones nuevas de las cuales no existen reportes.

En el tamiz realizado en los 27 exones, incluyendo los sitios de “splicing” (De corte y empalme) y la región del promotor del gen *RB1*, se encontraron 13 mutaciones

diferentes en 14/48 pacientes, nueve de las cuales fueron de origen germinal (64.3%). seis no habían sido reportadas en la literatura (**g.41925G>T**, **g.39518insGA**, **g.70274delT**, **g.150038delG**, **g.160796insT** y **g.1911G>T-149G>T**). De las 13 mutaciones detectadas, una de las mutaciones ocurrió en la región del promotor en la posición g.1911 (-149G>T), nueve en regiones exónicas (69.2%) y tres en sitios de “splicing” (23.1%). La mutación g.1911 no había sido reportada. De las mutaciones exónicas, cinco fueron mutaciones previamente reportadas y cuatro mutaciones nuevas. De las primeras, cuatro crean codones de paro: **W99X**, **R251X**, **R554X** y **R358X** (esta última se encontró en tres pacientes no relacionados entre sí), y una es una deleción de tres pares de bases que afecta el codón para fenilalanina en la posición 750 de la proteína (**ΔF750**). Las cuatro restantes fueron mutaciones nuevas que afectaron el marco de lectura (**125X**, **389X**, **610X** y **750X**). Otras mutaciones encontradas en este grupo de pacientes fueron tres que afectaron los sitios de “splicing”, dos previamente reportadas en el intrón 24 (**IVS24 +1G>A**, **IVS24+3delGAGT**) y una nueva en el intrón 3 (**IVS3-1G>T**). Es importante mencionar que en el tejido tumoral de un paciente se encontraron dos mutaciones diferentes: **IVS3-1G>T** y **-149G>T**, de las cuales esta última también se encontró en sangre periférica (Macías, 2008).

Todas las mutaciones de origen germinal encontradas en los pacientes se buscaron también en el DNA de los padres sin embargo, solamente se detectó un caso de no penetrancia en una familia donde la madre fue portadora de la mutación **ΔF750** y la heredó a su hijo afectado (CUADRO 5).

También se identificaron cinco variantes polimórficas en secuencias intrónicas diferentes dos de las cuales son nuevas, éstas incluyen dos transversiones en los intrones 3 y 4 (**41908C/A** y **42068G/T** respectivamente), dos transiciones en los intrones 19 y 25 (**156616A/G** y **174351T/A** respectivamente) y una deleción de seis pares de bases (T<sub>18</sub>-T<sub>24</sub>) (**161976del6T**) en un fragmento de politimidina localizado en la posición 161958-161981 (-39 to -16 del sitio de splicing) del intrón 21. Cada una de estas variaciones se encontró también en al menos uno de los padres de los pacientes (CUADRO 6, Figuras 10 -13).



En total seis mutaciones y dos de las variantes polimórficas encontradas no se encuentran registradas actualmente en la base de datos de mutaciones del gen *RB1* (<http://rb1-lsdb.d-lohmann.de>).

### **Análisis de pérdida de heterocigocidad (LOH)**

El análisis de LOH reveló que el DNA de sangre periférica era heterocigoto para al menos uno de los RFLP's en 36 (75%) de los pacientes, el 39.5% (19/48) fueron heterocigotos para **Bam HI** y 64.6% (31/48) fueron informativos para **Xba I**. Se encontró LOH en el 50% de los casos informativos: 7 se registraron en pacientes que son portadores de una mutación de origen germinal, tres en casos unilaterales con mutaciones somáticas y 8 en casos donde no se detectaron mutaciones asociadas al desarrollo del tumor (CUADRO 7). Finalmente es importante mencionar que 12/14 pacientes con mutaciones y 24/34 sin mutaciones resultaron informativos para al menos un alelo. Por otro lado, el análisis del origen parental de los alelos *RB1* reveló que los de origen paterno son los que se pierden con mayor frecuencia en el proceso de LOH (80%) (Macías, 2008).

CUADRO 5.- Mutaciones detectadas en los pacientes analizados.

Paciente	Sexo/E.I.	Lateralidad	Localización	Descripción	Consecuencia Putativa	Identificada en	LOH	Referencia
RB-19	M/4	B	Promotor Intron 3	g.1911G>T -149G>T g.41925 G>T	Sitio Sp1 Splicing	Sangre-Tumor Tumor	-	NUEVA NUEVA
RB-33	F/2	B	Exon 3	g.39478 G>A	W99X	Sangre-Tumor	+	Blanquet, 1995
RB-34	F/21	B	Exon 3	g.39518 insGA	(M113fs) 125X	Sangre-Tumor	+	NUEVA
RB-47	M/5	U	Exon 8	g.59683 C>T	R251X	Tumor	+	Cowell, 1994
RB-22	F/21	B	Exon 11	g.65386 C>T	R358X	Sangre-Tumor	+	Yandell, 1989
RB-2	F/5	U	Exon 11	g.65386 C>T	R358X	Tumor	+	Yandell, 1989
RB-46	F/4	U	Exon 11	g.65386 C>T	R358X	Tumor	+	Yandell, 1989
RB-6	F/0.5	B	Exon 12	g.70274 delT	(M387fs) 389X	Sangre-Tumor	+	NUEVA
RB-44	F/8	B	Exon 17	g.78169 insT	R554X	Sangre-Tumor	+	Lohmann, 1997
RB-37	M/1	B	Exon 18	g.150038 delG	(R579fs) 610X	Sangre-Tumor	+	NUEVA
RB-35	M/18	U	Exon 21	g.160796 insT	(V725fs) 750X	Tumor	-	NUEVA
RB-26	F/6	B	Exon 22	g.162049 delTCT	ΔF750*	Sangre-Tumor	+	Lohmann, 1994
RB-29	F/24	U	Intron 24	g.170403 +1G>A	Splicing	Tumor	-	Ritcher, 2003
RB-17	M/3	B	Intron 24	g.170405 +3delGAGT	Splicing	Sangre-Tumor	NI	Hogg, 1993

M: masculino; F: femenino; E. I. m: edad de inicio en meses; G: germinal; S: somático; U: unilateral; B: bilateral; +: pérdida de heterocigocidad, -: sin pérdida de heterocigocidad, NI: No Informativo. \*Mutación encontrada también en la madre del paciente. Las mutaciones han sido reportadas de acuerdo con el Ad Hoc Committee on Mutation Nomenclature (<http://www.retina-international.com/sci-news/mutnom.htm>) y Antonarakis (1998).

CUADRO 6. Polimorfismos encontrados en pacientes con RB.

SITIO (Intrón)	CAMBIO	ALELO 1	ALELO 2	REFERENCIA
3	g.41908 C/A	C	A	NUEVO
4	g.42068 G/T	G	T	Sivakumaran, 2005
19	g.156616 A/G	A	G	Mateu 1997.
21	g.161976 del 6T	T <sub>24</sub>	T <sub>18</sub>	NUEVO
25	g.174351 T/A	T	A	Yandell 1989

CUADRO 7.- Pérdida de heterocigocidad (LOH) en pacientes con RB.

POLIMORFISMO	Casos Informativos	LOH en casos con mutaciones	LOH en casos sin mutaciones	LOH TOTAL
	n = 36 %	N = 12 %	n = 24 %	n = 36 %
<b><i>Bam HI</i></b>	19 ( 39.5 )	8 ( 66.6 )	5 ( 21 )	13 ( 36 )
<b><i>Xba I</i></b>	31 ( 64.6 )	9 ( 75 )	7 ( 29 )	16 ( 44 )
<b><i>Bam HI</i> o <i>Xba I</i></b>	36 ( 75 )	10 ( 83.3 )	8 ( 33 )	18 ( 50 )

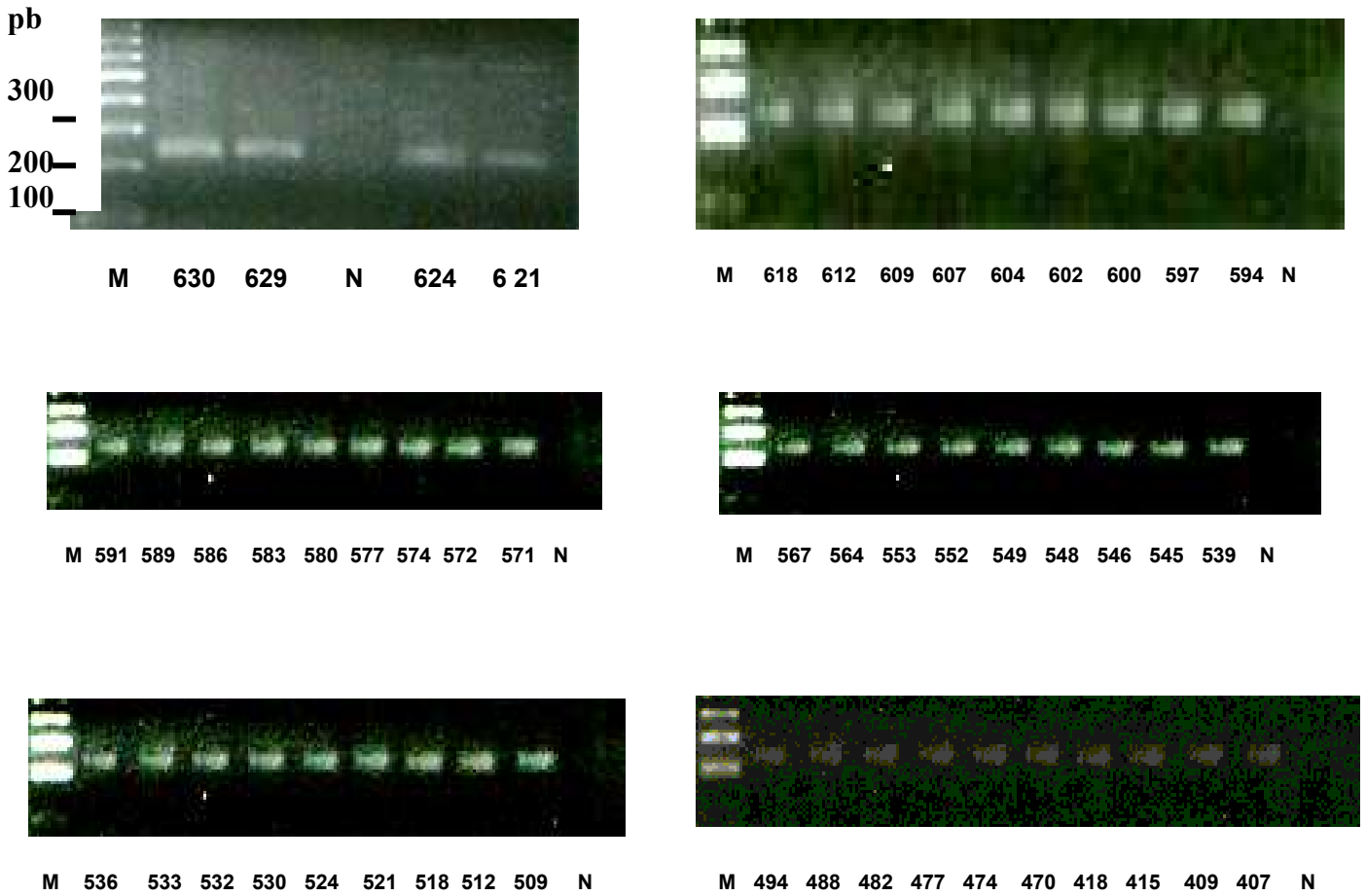


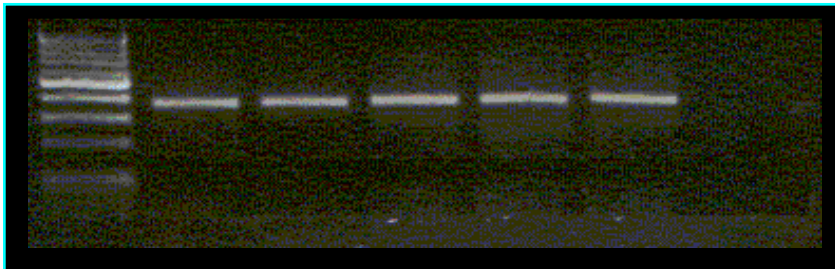
Figura 10. – **Amplificados de la secuencia del promotor del gen *RB1***. Se presentan los amplificados de 50 pacientes; **M**: marcador de peso molecular, **N**: control interno de reacción el cual no tiene DNA en la reacción y por lo tanto resulta negativo a la reacción de PCR, el tamaño del amplificado obtenido en todos los pacientes es de 240 pb, los productos obtenidos se sometieron a una segunda reacción de PCR, pero esta vez en presencia de material radioactivo ( $\alpha$ - $^{32}$ PdCTP) con la finalidad de realizar la detección de mutaciones por SSCP (Shimizu, 1994).

**Exón 2**



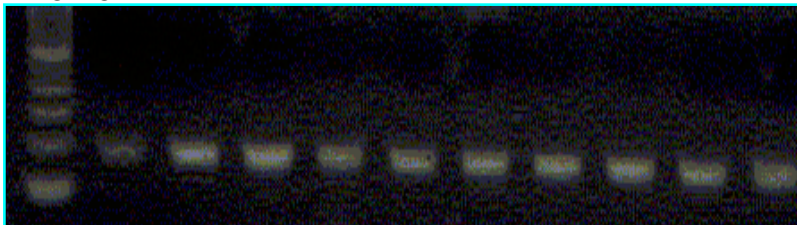
M 494 485 478 --- 477 474 467 427 418 415 488

**Exón 3**



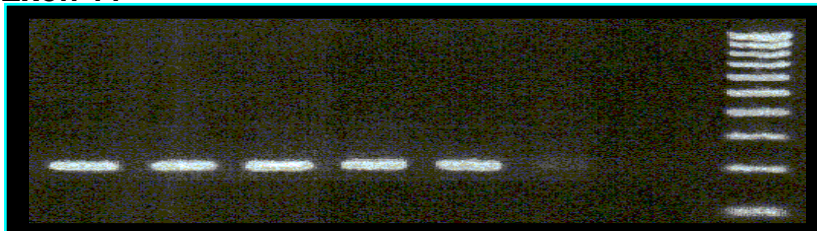
M 289 30 37 66 59 C

**Exón 5**



M 267 175 28 189 289 31 53 42 32 65

**Exón 11**



770 788 799 812 835 838 C M

Figura 11 . – **Amplificados de diferentes exones** del gen **RB1**. M: marcador de peso molecular, C: controles de reacción interna negativos en los cuales no se colocó DNA por lo tanto no se esperaban productos de la reacción de PCR.

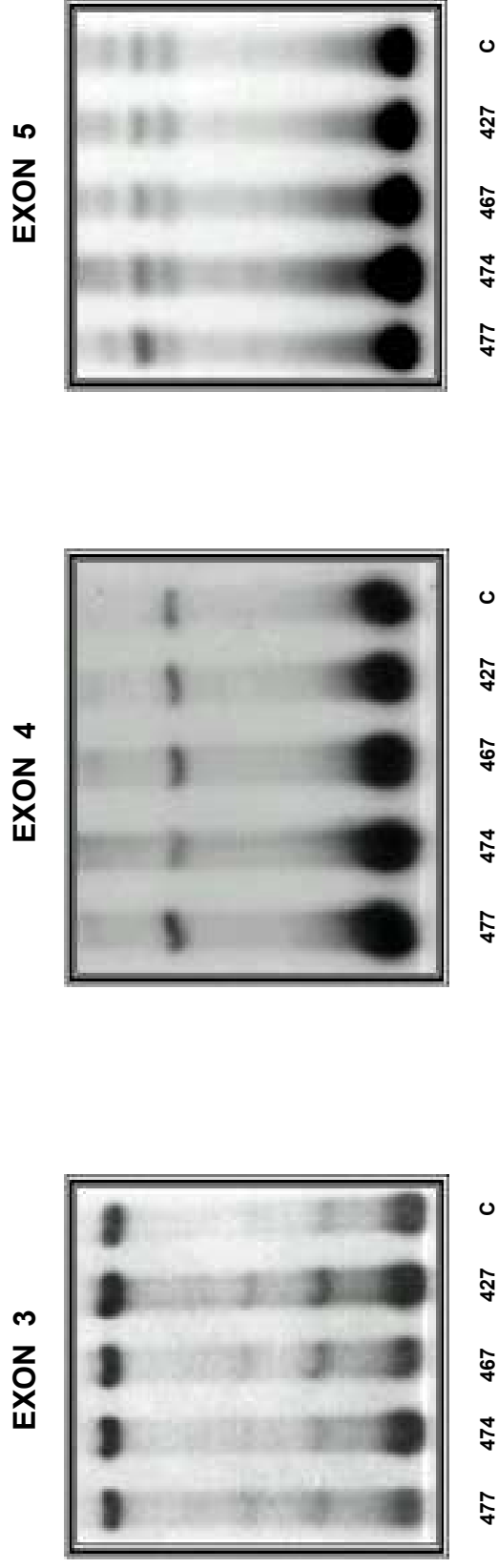


Figura 12.- **Patrones electroforéticos de SSCP en secuencias de DNA.** En la figura cada exon presenta un patron electroforético formado por un número de bandas ordenadas en una posición característica y en el mismo número en cuatro pacientes (477, 474, 467 y 427) y un individuo de control ( C ), un individuo portador de una mutación en alguno de estos exones presentaría un número de bandas diferente o un patrón de bandas también diferente.

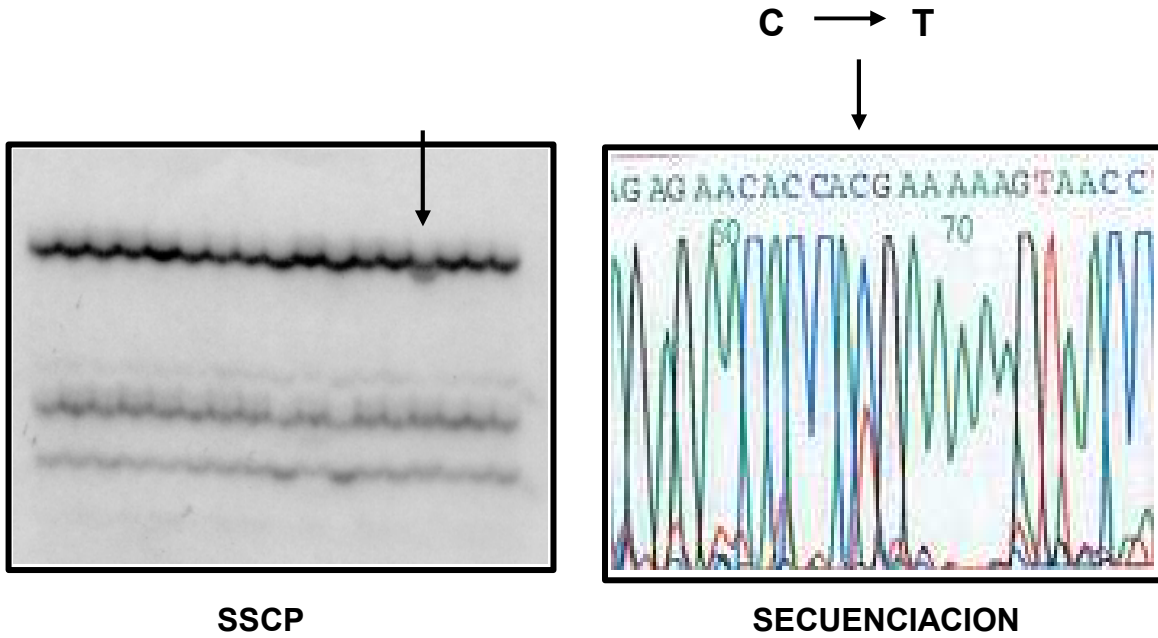


Figura 13. – **Secuenciación automatizada.** En esta figura se muestra una superposición de curvas entre una citosina y una timina detectada inicialmente en un patrón de SSCP anormal en 1 de 17 muestras (figura de la izquierda), la cual al ser analizada por secuenciación (figura de la derecha) reveló que el paciente presenta una mutación que consiste en un cambio de una citosina (C) por una timina (T) en uno de sus alelos (g.65386 C>T). El cambio C → T se reporta con mucha frecuencia entre las mutaciones puntuales que afectan al gen *RB1*.

## ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL GEN *RB1* EN MUESTRAS DE TUMORES POR TRANSCRIPCIÓN REVERSA (*in vitro* e *in situ*) E INMUNOHISTOQUÍMICA.

En la sección anterior, se detectaron mutaciones en el gen *RB1* en 14 de 48 pacientes estudiados. Para el análisis de expresión del gen *RB1* se seleccionaron los tumores de 34 de esos 48 pacientes, cuyas condiciones histológicas cumplían con las requeridas para la obtención de RNAm y el ensayo de RT-PCR *in situ*. Con el propósito de incrementar el tamaño de la muestra se agregaron al estudio 32 tumores captados durante el desarrollo experimental (ANEXO VI). Todas las muestras (n=66) fueron analizadas mediante RT-PCR *in vitro*.

Se seleccionaron veinticinco de las 66 muestras analizadas por RT-PCR *in vitro*, y se analizaron también por RT-PCR *in situ*. Los resultados se consideraron positivos cuando se obtuvo el cDNA del gen *RB1* por transcripción reversa *in situ*, *in vitro* o por ambas. En 32 de las 66 muestras (47%) se logró sintetizar el cDNA correspondiente al gen *RB1* (CUADRO 8, Figuras 14 -16).

CUADRO 8.- Muestras analizadas por transcripción reversa *in situ*, *in vitro* o por ambas.

Material analizado	Número de muestras captadas.	Muestras analizadas por RT-PCR <i>In situ</i> .	Muestras analizadas por RT-PCR <i>in vitro</i> .	Muestras positivas
Incluido en Parafina	66	25	-----	6
Incluido en 70% Ethanol	66	-----	66	32

Seis de las muestras de parafina resultaron positivas por RT-PCR *in situ* y se encuentran incluidas en el grupo de las 32 que también resultaron positivas por RT-PCR *in vitro*.



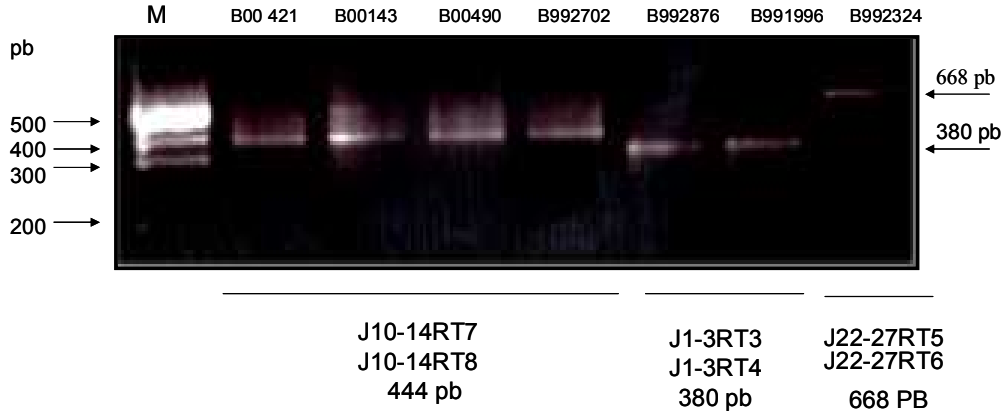


Figura 14.- **Síntesis de cDNA.** La amplificación del cDNA obtenido a partir del RNAm de cada muestra tumoral se llevó a cabo en tres fragmentos utilizando tres diferentes pares de primers. Los tamaños obtenidos para cada fragmento son 444pb, 380pb y 668 pb. M: Marcador de pesos moleculares, B00421 a B992324 corresponden a las muestras analizadas en la figura.

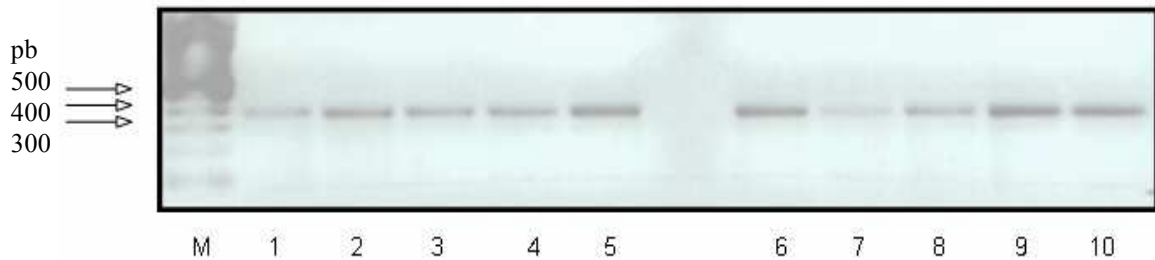
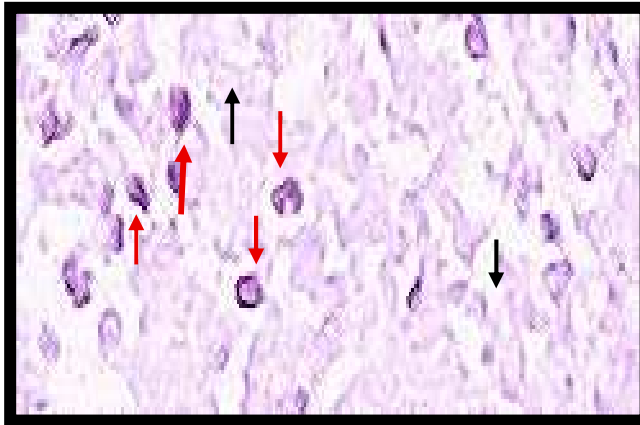
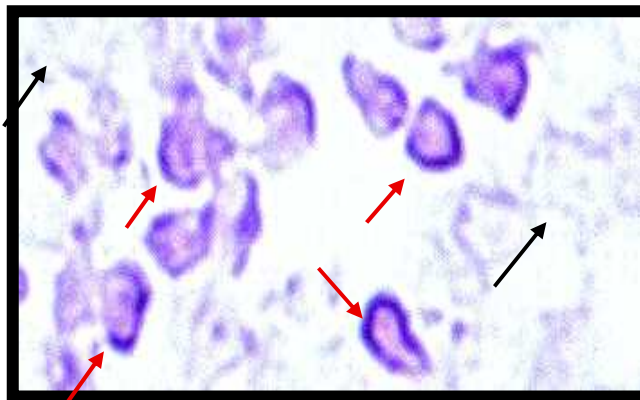


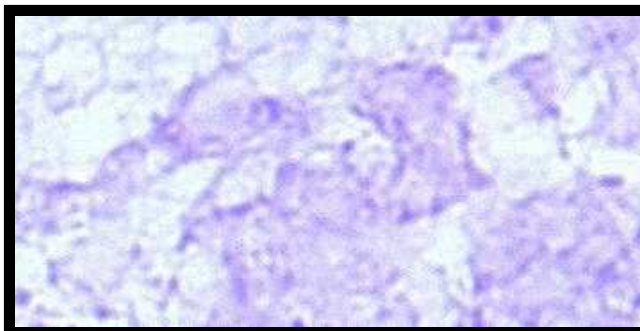
Figura 15.- **Síntesis de cDNA *in vitro*.** Los mejores resultados se obtuvieron al utilizar los primers J1-3RT3/J1-3RT4 los cuales abarcan la secuencia que constituye los primeros 3 exones del gen *RB1*. Se muestran los resultados de 10 muestras diferentes.



Tejido B01-1158 (10X)



Tejido B01-2389 (40X)



Control Negativo (40X)

Figura 16.- **Síntesis de cDNA del gen *RB1* *in situ*.** Las flechas rojas indican la síntesis de cDNA *in situ* en el citoplasma de las células, las flechas negras indican células sin síntesis de cDNA.

Para el análisis por inmunohistoquímica se incluyeron 54 muestras utilizando anticuerpos monoclonales para la proteína pRB110 de las cuales 30 resultaron positivas. En resumen el análisis de expresión del gen *RB1* reveló que de 66 muestras analizadas, 33 resultaron positivas a cDNA *in vitro*, de las cuales sólo 10 resultaron positivas tanto a la síntesis de cDNA como a la presencia de la proteína pRB110 por inmunohistoquímica (Figura 17).

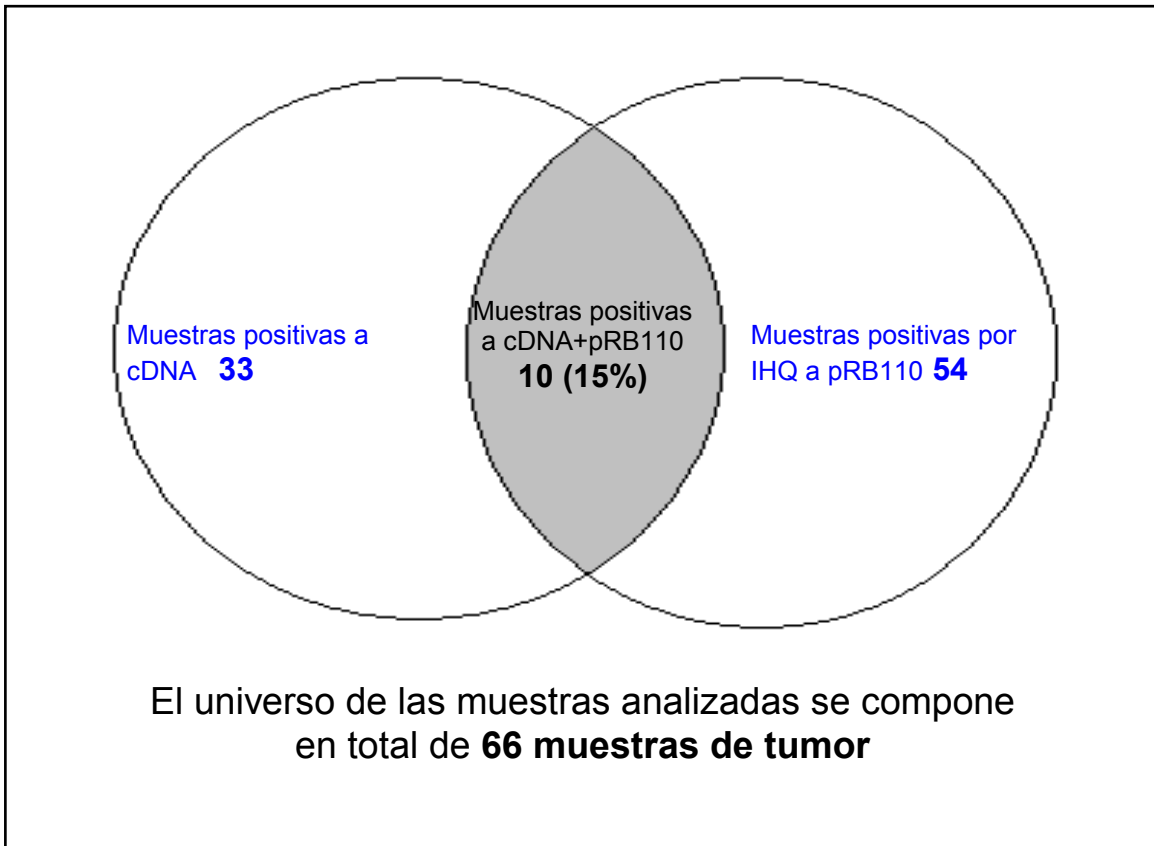


Figura 17.- **Muestras positivas por Inmunohistoquímica.** De las 10 muestras que resultaron positivas a ambas pruebas solamente dos no fueron analizadas previamente para buscar mutaciones en el gen *RB1*, las otras ocho corresponden a pacientes afectados con la forma unilateral en los cuales no se detectaron mutaciones asociadas.

### **Búsqueda del genoma viral en muestras tumorales.**

Para determinar si el virus del papiloma humano (VPH) se encontraba presente en los tumores, se analizaron muestras de tumores embebidos en parafina mediante PCR *in situ* e incluidos en alcohol al 70% mediante PCR en punto final. Para este estudio se eliminaron aquellas muestras que presentaron necrosis o calcificaciones. A las muestras se les realizó un tamiz para detectar secuencias del DNA viral por PCR en punto final, ya que esta técnica ha demostrado ser altamente sensible y de acuerdo a los ensayos de titulación viral reportados en la literatura, permite la detección de diferentes tipos de VPH y su sensibilidad es del orden de menos de 10 copias del genoma viral por célula.

Para evitar la contaminación cruzada de las muestras y reactivos utilizados, las extracciones de DNA y el manejo de reactivos se realizaron en departamentos separados, con equipo y materiales utilizados sólo para cada propósito. En todas las muestras se llevó a cabo la amplificación del gen de la  $\beta$ -globina (150 pb) y de la  $\beta$ -actina (20 pb) como controles endógenos de la integridad del DNA y como controles de amplificación de fragmentos pequeños. Posteriormente se realizó la reacción de PCR en punto final para detectar el DNA viral en todas las muestras empleando los juegos de nucleótidos MY09/11 y Gp5+ / Gp6+, los cuales amplifican fragmentos de la región L1 de 450 y 150 pb respectivamente. Por otra parte, también se realizaron ensayos separados para cada par de nucleótidos incluyendo controles negativos internos y controles positivos para VPH, como el DNA obtenido a partir de las líneas celulares CaLo, HeLa y CaSki (Figuras, 18-20). Todas las muestras analizadas resultaron negativas para la presencia del VPH. Para validar estos resultados se procedió a buscar el genoma viral directamente en el tejido tumoral mediante la técnica de PCR *in situ* (Figura 21). Aún más, el análisis de hibridación *in situ* (HIS) para detectar la presencia del RNAm de tipo viral, también resulto negativo a la presencia del virus (Figura 22). Este análisis fue completado con inmunohistoquímica (IHQ) utilizando anticuerpos monoclonales para las proteínas E6/E7 de origen viral, en 45 tumores y, de acuerdo con los resultados anteriores, en ninguno de ellos se detectó la presencia las proteínas virales (Figura 23).

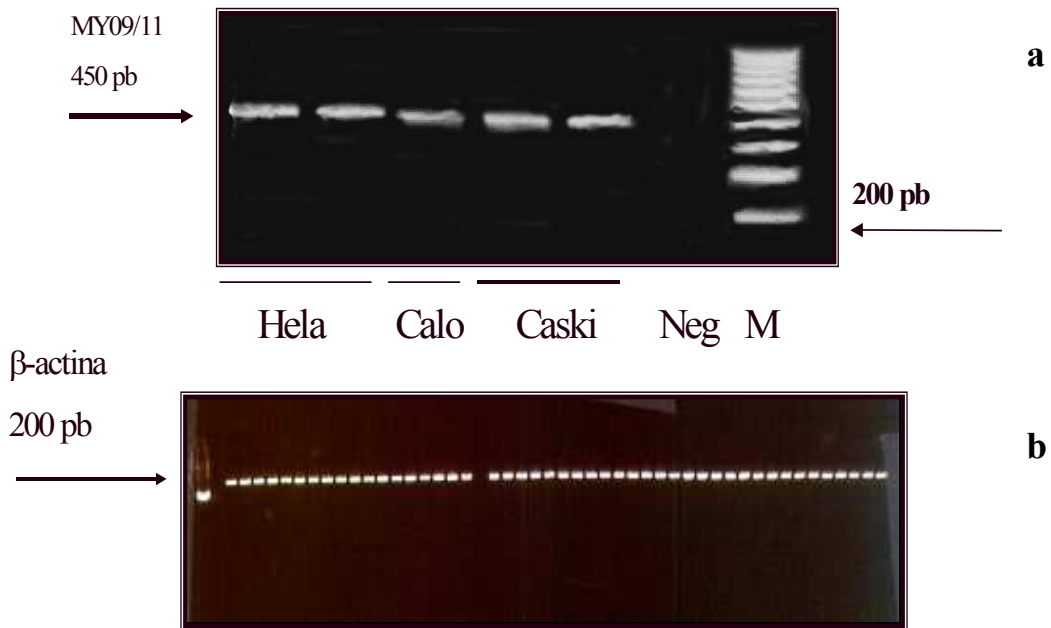


Figura 18.- **PCR en punto final de secuencias para VPH en células HeLa y Caski.** a) Se utilizaron líneas de control positivas para VPH como controles positivos. Los oligonucleotidos MY09/11 amplifican una secuencia consenso de 450 pb. b) También se amplificó el gen de la  $\beta$ -actina de 200 pb como una prueba de integridad del DNA para amplificar fragmentos pequeños en todas las muestras.

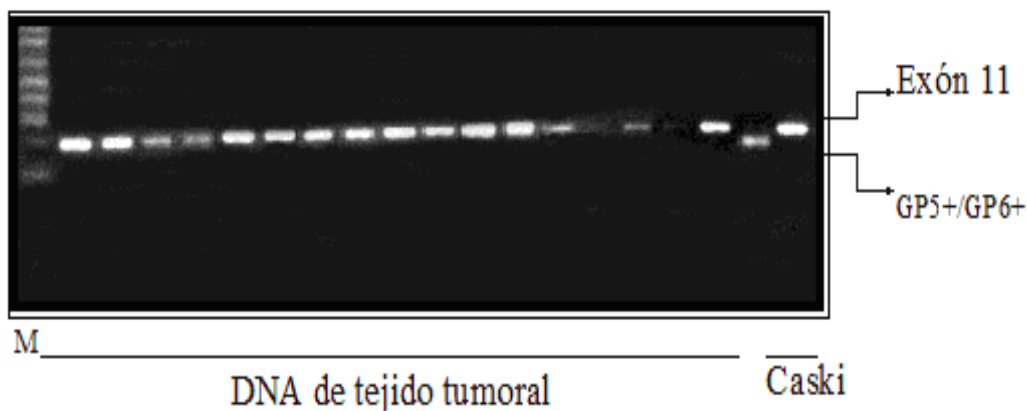
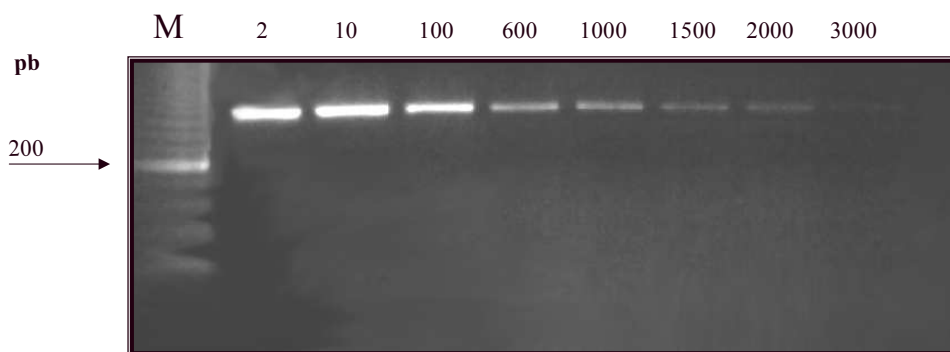


Figura 19.- **Coamplificación del exon 11 del gen *RB1* y VPH.** PCR donde se pretendía amplificar al mismo tiempo el exon 11 del gen *RB1* y una región conservada de VPH con los oligonucleótidos GP5+-GP6+. En el control positivo CaSki amplificó el exon 11 y además resultó positivo a VPH, mientras que en las muestras de tejido tumoral amplificó el exon 11 pero todas resultaron negativas para VPH.

### Detección del genoma viral



DIL	[ ADN ]	Dil	[ ADN ]
2	327.5 ng / $\mu$ L	1000	0.7 ng / $\mu$ L
10	65.6 ng / $\mu$ L	1500	0.4 ng / $\mu$ L
100	6.5 ng / $\mu$ L	2000	0.3 ng / $\mu$ L
600	1.0 ng / $\mu$ L	3000	0.1 ng / $\mu$ L

Figura 20.- **Cinética de sensibilidad de amplificación de VPH.** Se realizó una prueba de la sensibilidad de las condiciones de análisis empleando una cantidad conocida previamente de DNA de un control positivo

**M en BE Miguel Macías Vega**

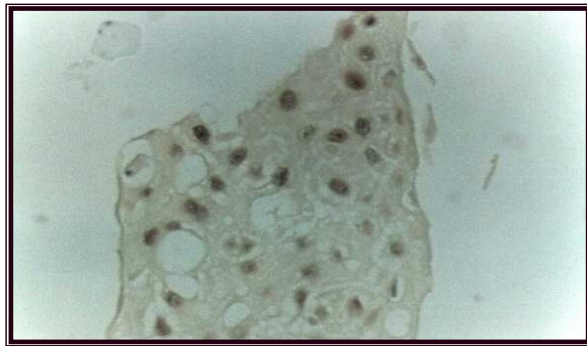
para VPH, en este caso de la línea celular SiHa además, en el sistema de amplificación se encontró una eficiencia de detección hasta una concentración igual a 0.1 ng/μl de material genómico de origen viral. M: marcador de pesos, Dil: diluciones con concentraciones preestablecidas.

**Control positivo a VPH16 por PCR *in situ***

**A)**



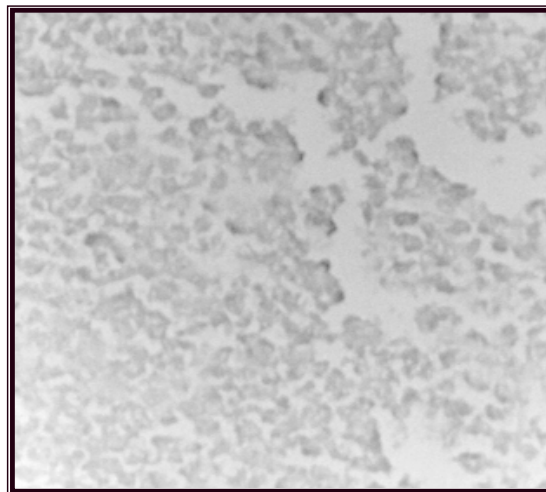
**( 40 X )**



**(10 X )**

**Búsqueda de VPH en un tumor RB por PCR *in situ*.**

**B)**

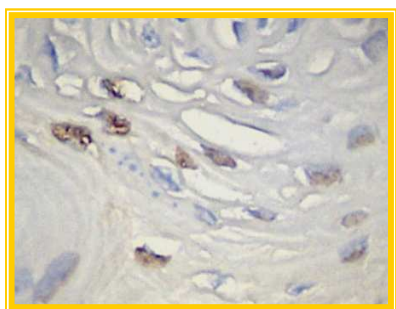


**Muestra rb 1336 negativa a VPH**

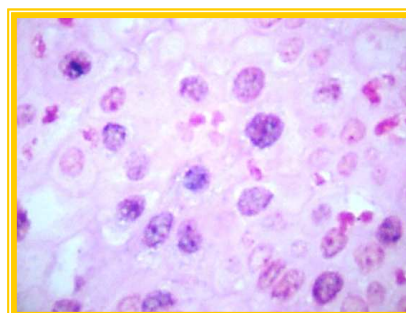
Figura 21.- **Análisis por PCR *in situ*.** **A)** Tejidos de control positivo procedentes de un paciente afectado con papiloma faríngeo diagnosticados histopatológicamente como positivo a VPH. **B)** Las 66 muestras de pacientes afectados con retinoblastoma analizadas por esta técnica resultaron negativas.



Figura 22.- **Tumor RB negativo.** Muestra de un paciente afectado con RB que resultó negativa por hibridación *in situ* (HIS) e inmunohistoquímica (IHQ) a la presencia del VPH.



Cérvix positivo a VPH 16



Papiloma faríngeo positivo por ISH a VPH tipo 11

Figura 23.- **Análisis por IHQ de Ca Cu y papiloma faríngeo.** Se utilizaron como controles positivos tejidos positivos a VPH y los anticuerpos utilizados en cada caso fueron específicos para VPH/16 y VPH/18, ninguno de los tumores de RB fue positivo a VPH.



## **DISCUSION**

El retinoblastoma es la segunda neoplasia más importante en la población infantil en México (Leal-Leal, 2004); Hay dos formas de presentación del retinoblastoma, la forma hereditaria que ocurre aproximadamente en un 40% de los casos y la forma no hereditaria o esporádica en el resto de los pacientes. En la hereditaria, un 10% corresponde a la forma familiar, es decir cuando existe más de un miembro afectado en una familia, y un 30% a mutaciones *de novo* en la línea germinal de uno de los progenitores. En la forma familiar, el fenotipo tumoral segrega de forma dominante con una penetrancia del 90%, ello significa que la herencia de un gen mutante predispone a que se desarrolle el tumor en 9 de cada 10 casos. La edad media de diagnóstico es de 18 meses, diagnosticándose más precozmente en los casos bilaterales (12 meses) que en los unilaterales (24 meses).

El tumor tanto en su forma hereditaria como no hereditaria se desarrolla por la inactivación del gen *RB1*, fenómeno causado frecuentemente por mutaciones de tipo puntual. Sin embargo, como ya se mencionó antes, existe una proporción de casos con retinoblastoma (20%) en los que no se han encontrado mutaciones en el gen *RB1* asociadas al desarrollo del tumor (Gallie 1999, Alonso 2001 y Valverde 2005) y además en algunos estudios realizados en las muestras de DNA procedente de tumores de pacientes con retinoblastoma bilateral o unilateral se han observado mutaciones en un 80% de ellos, en cambio estudiando el DNA de sangre periférica de pacientes con retinoblastoma hereditario las mutaciones aparecen en sólo un 30% de los casos (Martín, 2001).

Por otro lado en investigaciones previas se ha encontrado que los casos con retinoblastoma unilateral son más frecuentes en nuestra población que lo reportado en la literatura para otras poblaciones y según Orjuela (2000) el 33% de los pacientes con retinoblastoma esporádico son positivos al VPH; esto, aunado a las evidencias presentadas por otros grupos de investigación de que en los países como México, donde la incidencia del cáncer cervico uterino es alta, la frecuencia de RB es mayor, hace suponer que el VPH de alto riesgo juega un papel preponderante en la oncogénesis del retinoblastoma. Así en esta tesis el objetivo principal se dirigió a determinar cuales son

los mecanismos de oncogenesis del Retinoblastoma en pacientes del Instituto Nacional de Pediatría.

Para cumplir con el objetivo se captó una población de 66 pacientes diagnosticados clínicamente con retinoblastoma, de ellos el 95% presentaron leucocoria como principal signo de diagnóstico, de acuerdo con lo reportado en la literatura, donde se describe que la leucocoria es la manifestación más frecuente en el retinoblastoma. Otro de los signos en el RB es el estrabismo, el cual se presentó el 5.0 % de nuestros pacientes. El análisis del pedigrí reveló que sólo el 6.25% tenía antecedentes familiares, de los cuales uno era unilateral y dos eran bilaterales. De este mismo análisis se detectó la no penetrancia en el 11.6% de los casos, similar a lo reportado en la literatura (10%) en otras poblaciones. Estos datos cobran importancia para el asesoramiento genético, ya que son individuos sin manifestaciones clínicas. Así el riesgo de recurrencia en una pareja con antecedentes de RB hereditario, calculando una penetrancia cerca del 90%, es del 45% en cada embarazo.

Uno de los principales problemas en el asesoramiento genético del retinoblastoma reside en el diagnóstico de los casos con retinoblastoma unilateral hereditario debido a que el 10-15% de los pacientes con retinoblastoma unilateral, son hereditarios, por lo tanto algunos casos con la forma unilateral pueden ser erróneamente diagnosticados como no-hereditarios. El riesgo de este diagnóstico erróneo puede incrementarse en poblaciones como la nuestra donde encontramos que el 51.9% de los pacientes (14/27) con retinoblastoma unilateral desarrollaron el tumor antes del primer año de edad y además el 37% manifestaron la enfermedad durante los primeros seis meses de edad, muy similar a la edad de inicio reportada en los pacientes con la forma bilateral. Parece ser que el RB se manifiesta más tempranamente en algunas poblaciones como la hispana, aunque la edad de inicio temprano también se ha reportado en Argentina, España, y Cuba entre otras poblaciones, (Alonso 2005,a Alonso, 2005 b; Dalamon, 2004; Mastrangelo, 2007; Rodríguez 2002).

Es importante mencionar que estudios recientes en pacientes con RB unilateral, han reportado que la edad de inicio no muestra diferencias significativas entre los pacientes con mutaciones caracterizadas y aquellos sin caracterizar (Shuler, 2005). De acuerdo con nuestros resultados, la edad de inicio del padecimiento no es un parámetro útil para establecer un diagnóstico diferencial entre la forma unilateral hereditaria y la no

hereditaria. Por otro lado sabemos que el diagnóstico molecular puede ser una herramienta valiosa para un manejo clínico más eficiente, incluyendo un consejo genético más confiable a las familias afectadas (Joseph, 2004; Kumaramanickavel, 2003; Raizis, 2002 y Richter, 2003)

El tamiz molecular realizado mediante el análisis de polimorfismo conformacional de cadena sencilla de DNA (SSCP), complementado con secuenciación incluyendo los 27 exones, sitios de “splicing” y el promotor del gen *RB1*, en 48 familias, permitió detectar 13 diferentes mutaciones oncogénicas en 14 pacientes (29%). Seis de estas mutaciones no habían sido reportadas previamente (46.15%). Las mutaciones más frecuentes fueron aquellas que ocasionaron cambios en el marco de lectura y la creación de codones terminación (30.8% cada una) seguidas por las mutaciones que afectan los sitios de “splicing” (23%), y mutaciones en el promotor y en sentido erróneo (7.7% respectivamente). En un estudio previo, Rodríguez y cols. (2002) reportaron sólo 5 mutaciones en 3/19 pacientes mexicanos: 3 afectan el marco de lectura, y una de sentido erróneo y una más resulto ser un polimorfismo. Aunque las mutaciones detectadas por Rodríguez y cols fueron escasas, sus resultados y los nuestros sugieren que las mutaciones en el marco de lectura son las que más prevalecen en los pacientes mexicanos afectados con retinoblastoma. Estos resultados son similares a los reportados en pacientes del sur de Europa (Blanquet et al, 1995), pero diferentes, a los reportados en pacientes del norte de Europa (Alemania y el Reino Unido), donde la sustitución de nucleótidos de sentido erróneo parecen ser las mutaciones más comunes (Yilmaz et al., 1998; Lohmann et al. 1996, 1997 y Harbour, 1998).

Aunque las diferencias en el tipo de mutaciones más comunes entre distintos grupos étnicos no han sido bien documentadas para el retinoblastoma, en otras enfermedades mendelianas, como la fibrosis quística, estas diferencias se encuentran ampliamente reportadas (Orozco, 2006), por lo que es posible que los antecedentes étnicos puedan determinar el comportamiento de las mutaciones en el gen *RB1*. Por lo tanto, el espectro de mutaciones en el gen *RB1* en pacientes mexicanos podría reflejar la influencia étnica de las poblaciones del sur de Europa, dado que los genes de origen europeo constituyen alrededor del 40% de la carga génica de la población mestiza-mexicana. Sin embargo, es necesario realizar estudios donde se incluyan tamaños de muestra más grandes de

pacientes con retinoblastoma para poder delinear el espectro de la distribución geográfica de las mutaciones en nuestra población.

Por otro lado, se detectaron mutaciones constitutivas en 9 pacientes; en uno de ellos se identificaron dos mutaciones: una somática (g.170403 IVS24+1G>A) y una constitucional (-149G>T), lo cual sugiere que el primero y segundo evento mutacional, de acuerdo con Knudson, ocurrieron por dos mecanismos independientes y lo más probable es que se trate de dos mutaciones independientes que ocurrieron al azar en el mismo paciente. Por otra parte, este hallazgo podría indicar que el paciente tiene una alta predisposición a sufrir mutaciones en el gen *RB1*. En otro caso, observamos un ejemplo de no penetrancia en una madre clínicamente sana, la cual es portadora de una delección de 3pb del codón de fenilalanina en la posición 750 de la proteína pRB110 ( $\Delta F750$ ), la cual fue heredada a su hijo afectado con retinoblastoma.

Generalmente las mutaciones de sentido erróneo y las delecciones e inserciones pequeñas que conservan el marco de lectura, dan lugar a una proteína RB110 mutante con una actividad residual (alelo débil). Presumiblemente la mutación  $\Delta F750$  podría permitir a la proteína una actividad residual suficiente para evitar el desarrollo del tumor y conducir a una no penetrancia de la enfermedad (Onadim et al., 1992; Otterson et al., 1997, Cowell and Bia, 1998).

También se observaron cinco diferentes polimorfismos en los pacientes analizados (Tabla 11), tres de ellos fueron nuevos (41908C/A, 42068G/T y 161976del6T). Es muy probable que estos cambios intrónicos sean poco frecuentes en la población mexicana debido a que fueron identificados solamente en un paciente. La delección de 6 pb del fragmento de politimidina ( $T_{18-24}$ ) localizado en el intrón 21 resultó particularmente interesante, ya que fue documentada en un paciente en el cual no se detectó ninguna otra mutación y sus padres además de ser sanos, portan el fragmento de politimidina de tamaño normal (24 bases); se sabe que existen fragmentos de polinucleótidos localizados en los intrones que pueden afectar la expresión de un gen, un ejemplo, está bien documentada una variante del fragmento de politimidina en el gen regulador de la conductancia transmembranal de la Fibrosis Quística (CFTR) localizada en el sitio aceptor del intrón 8 (IVS8-T). Esta variante polimórfica consiste de cinco, siete y nueve timidinas (5T, 7T y 9T

respectivamente), donde la variante 5T produce un nivel muy bajo de RNAm (del gen CFTR) comparado con los transcritos de los alelos 7T y 9T y está asociado con casos de FQ atípica y ausencia bilateral congénita de vasos deferentes (CBAVD) (Chu et al. 1993). El papel molecular de estos fragmentos de poliTs en fibrosis que dan como resultado la presencia de “splicing” alternativo que conducen a la ausencia de exones constitutivos en muchos RNAm no es muy conocido, pero podrían estar involucrados con la penetrancia y la severidad de las enfermedades. En este trabajo no se realizó un análisis para la variante 161976del6T, sin embargo, no se puede descartar un posible papel oncogénico para esta delección de 6pb de timidina.

Para estudiar la pérdida de heterocigocidad en cada tumor, se analizaron dos marcadores intragénicos (RFLP's) del gen *RB1*: intron1/*BamH I* y intron 17/*Xba I*. Se observó heterocigocidad constitucional en el 75% de los pacientes, para al menos uno de los loci polimórficos estudiados, siendo mayor en los tumores que tenían mutaciones (83.3 vs. 33%). Esta frecuencia de LOH en el cromosoma 13q14.1 fue menor a la reportada previamente por otros autores (Choy, 2002, Zhu et al. 1992; Lohmann et al, 1997), este resultado podría deberse quizá a que los marcadores que se utilizaron son poco informativos o debido a que la inactivación de la expresión del gen *RB1* por este mecanismo, es menos frecuente en nuestra población; el momento en el cual ocurre la LOH también puede ser un factor importante para el crecimiento de tumores RB en pacientes con la forma unilateral no hereditaria, en otras palabras, si un mecanismo similar es responsable del segundo evento en los tumores no hereditarios, el tumor podría aparecer más tardíamente que lo observado en este estudio (30%).

Por otra parte, Kato y cols (1995) han reportado que los tumores que han perdido el alelo materno se desarrollan más tardíamente que aquellos que han perdido el alelo paterno. Los mismos autores también han reportado que la presencia de un locus localizado cerca del gen *RB1* conduce a un “imprinting” materno de genes aledaños al gen *RB1*, jugando un papel importante en el retraso de inicio del desarrollo del tumor (Kato et al., 1996); esta hipótesis no es concordante con nuestros resultados, ya que en ambos casos los tumores que retuvieron el cromosoma materno tuvieron un inicio temprano del retinoblastoma.

Aunque en este trabajo se analizaron todas las regiones codificantes del gen *RB1*, incluyendo el promotor, es notable la baja proporción de mutaciones detectadas (14/48); este pequeño índice de mutaciones puede atribuirse a la sensibilidad del SSCP, el cual puede no ser suficiente para detectar todos los cambios en el DNA; sin embargo, podrían estar involucrados otros factores en la génesis del retinoblastoma, tales como la metilación del DNA o algunos factores ambientales y epigenéticos (Mastrangelo, 2007).

En cuanto al análisis de expresión del gen *RB1* en los tumores, nuestros resultados muestran un índice elevado de la presencia de RNAm a través de la detección de cDNA y la proteína pRB110 en estudios separados. Aunque, no logramos descartar que algunos tejidos pueden estar contaminados con células vecinas de origen no neoplásico, nuestros resultados muestran que solamente el 15% de los 66 casos analizados son positivos a ambas pruebas, lo cual sugiere que efectivamente existe algún factor asociado al desarrollo del tumor ajeno a la presencia de mutaciones en el gen *RB1*; hipótesis que en su momento apoyaría la posible participación del VPH, tal como se propuso por Orjuela y cols (2000), quienes reportaron la presencia del VPH en tumores RB de pacientes mexicanos. Sin embargo, en este trabajo los resultados arrojados de la búsqueda por 5 estrategias diferentes, tales como síntesis de cDNA por transcripción reversa de la polimerasa *in vitro* e *in situ*, inmunohistoquímica, PCR punto final *in vitro* e *in situ*, fueron en todos los casos negativos. Es importante considerar que hasta la fecha se sabe que los diferentes tipos de VPH conservan su epiteliotropismo, es decir se han encontrado infectando de manera exclusiva tejidos constituidos por epitelios (cubierta externa de los órganos), como piel, vías áreas superiores, bronquios y genitales aunque el mecanismo que permite que ocurra especificidad tisular aun no es totalmente conocido, este es un aspecto muy importante ya que histológicamente las células de la retina difieren mucho histologicamente de los epitelios que pueden contener al VPH aun de manera episomal y por lo tanto la probabilidad de encontrar al VPH en la retina humana es si no imposible si muy remota lo cual se confirma con los resultados obtenidos en este trabajo, por otro lado los casos documentados de transmisión del virus al momento del nacimiento en un parto eutócico o normal son aquellos relacionados con papilomatosis respiratoria recurrente (papiloma laringeo) causada por el virus papiloma humano tipos 6 y 11 que se transmite por vía vertical de una madre con infección anogenital activa o latente (Rojo, 2001; Syrjänen, 2003; DeVoti, 2004; Szeps, 2005) donde encontramos que los epitelios

implicados se asocian con el tipo de virus necesario para desarrollar papilomatosis y no se asocian a las variantes oncogénicas como el VHP16 y VPH18.

Así, este estudio muestra entonces que la génesis del retinoblastoma debido a la inactivación del gen *RB1* es causada principalmente por mutaciones que impiden la expresión del gen *RB1* y por la pérdida de heterocigocidad y aún cuando la participación del virus papiloma en la oncogénesis del retinoblastoma no fue confirmada, no podemos descartar la presencia de otros factores involucrados en la génesis del tumor explicando así, el comportamiento del retinoblastoma que se desarrolla tempranamente en la población mexicana.

En otro sentido, en los últimos años la identificación de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs, “single nucleotide polymorphisms”) y de sus haplotipos, ha permitido su asociación con diferentes enfermedades y con la respuesta individual al tratamiento (Venus, 2006). En el gen *RB1* en particular, los SNPs se han clasificado en dos grupos: de baja ( $\leq 5\%$ ); y de alta frecuencia ( $\geq 5\%$ ). De acuerdo con investigaciones recientes, en el gen *RB1* la presencia de algunos haplotipos derivados de 15 SNPs son factores de riesgo para la forma hereditaria de la enfermedad, mientras que otros se han relacionado con el pronóstico y algunos se propone que están relacionados con la variabilidad en la respuesta al tratamiento, además de estar asociados a otras formas de cáncer principalmente de mama y ovario (Lesuer, 2006; Honglin, 2006). Los polimorfismos de un sólo nucleótido descritos en el gen del retinoblastoma son relativamente escasos. En la base de datos de mutaciones en el gen *RB1* (<http://www.d-lohmann.de/Rb/mutations.html>) que recoge de manera exhaustiva las mutaciones publicadas, sólo se describen 28 polimorfismos. Esta es una cifra muy baja, considerando las dimensiones del gen (180,000 nucleótidos) y la frecuencia media de SNPs (1 por cada 500 nucleótidos), por lo que cabe esperar la existencia de unos 360 SNPs en este gen.

En un estudio realizado en pacientes procedentes de diferentes regiones españolas, se identificaron cinco SNPs en 50 familias con RB hereditario (Alonso, 2001b); que confieren riesgo para el desarrollo del RB, lo cual podría potencialmente ser aplicado en la prevención, pronóstico y/o seguimiento de pacientes susceptibles a padecer RB, aún más esta aplicación puede extenderse a otros tumores asociados con el gen *RB1*. Este

antecedente resulta muy interesante si consideramos la carga genética de origen hispano que se encuentra en la población mexicana.

## **CONCLUSIONES**

La proporción de casos con RB unilateral que se manifiestan antes del primer año de edad fue significativamente mayor al esperado según los reportes de la literatura.

El 93% de los pacientes con mutaciones somáticas o germinales fueron clasificados como *de novo* por no encontrarse en los padres.

Sólo el 29% de los pacientes tiene una mutación asociada al gen *RB1*.

El 75% de los casos fue informativo para al menos uno de los polimorfismos analizados (38% para *BamH I* y 64% para *Xba I*) y el 50% presentaron pérdida de heterocigocidad en al menos un locus.

El análisis del origen parental reveló que los alelos de origen paterno son los que se pierden con mayor frecuencia en el proceso de LOH (80%).

No se presentaron diferencias significativas en el inicio de las manifestaciones del tumor entre aquellos que presentaron LOH en el alelo materno y los que la presentaron en el alelo paterno.

La elevada incidencia de casos con RB unilateral que se presenta antes del primer año de edad no está asociada a la infección con VPH.

El VPH no participa en la oncogénesis del retinoblastoma en estos pacientes.

El bajo índice de mutaciones detectadas en los pacientes afectados con la forma unilateral no fue útil para realizar el diagnóstico diferencial entre las formas esporádica y hereditaria en este grupo.



***M en BE Miguel Macías Vega***

El 15% de las muestras positivas a cDNA y pRB110 podría apoyar la propuesta de factores asociados al desarrollo del RB sin la intervención de mutaciones.

La expresión positiva del gen en muestras sin mutaciones confirma la incidencia reportada en la literatura de un 20 a 30% de casos con la forma bilatral sin mutaciones asociadas.

Es probable que la expresión del gen *RB1* esté determinada por factores tales como los haplotipos formados por los SNPs del gen *RB1* tal como lo proponen recientes evidencias experimentales.

## REFERENCIAS

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

Acikbas I, Keser I. 2002. Detection of LOH of the *RB1* gene in bladder cancers by PCR-RFLP. *Am J Surg Pathol* Apr 26:4::472-473.

Alonso J, García-Miguel P, Abelairas J, Mendiola M, Sarret E, Vendrell MT, Navajas A, Pestaña A. 2001 a. Spectrum of germline *RB1* gene mutations in Spanish retinoblastoma patients: phenotypic and molecular epidemiological implications. *Hum Mut* 17:412-422.

Alonso J, Moreno C, Lopez A, Mendiola M, Garcia-Miguel P, Abelairas J, Sarret E, Vendrell MT, Navajas A, Pestana A. 2001 b. Five novel single nucleotide polymorphisms of the *RB1* gene (g.5625T>C, g.70169T>G, g.76875A>T, g.78026delA, and g.150072T>C) in retinoblastoma patients. *Hum Mutat*. May;17(5):437.

Alonso J, Frayle H, Menendez I, López A, García-Miguel P, Abelairas J, Sarret E, Vendrell M, Navajas M, Artigas JM. 2005. Identification of 26 new constitutional *RB1* gene mutations in Spanish, Colombian and Cuban retinoblastoma patients. *Hum Mut*. 25:99.

Antonarakis S E. 1998. Recommendations for a Nomenclature System for Human Gene Mutations. Nomenclature Working Group. *Hum Mutat* 11:1-3.

Alui A, Hogg R, Rader J. 2002. Mutation screening analysis of the retinoblastoma related gene *RB/p130* in sporadic ovarian cancer and head and neck squamous cell cancer. *J Virol Jun*; 76:12:6224-6234.

Alvarez Salas Luis, López Bayghen Esther. 1995. Genética de los papilomavirus humanos genitales. *Salud Pública de México* 37:240-247.

Andi T, Kahn T, Pfuhl A, Nicola T, Erber R. 1998. Etiological involvement of oncogenic human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas lacking retinoblastoma cell cycle control. *Cancer Res* Jan; 58:1:5-13.

Anderson J, Han L, Panton R, Branco P and Gallie B.2003. Sensitive and efficient detection of RB1 gene mutations enhances care for families with retinoblastoma. *Am J Hum Genet* 72:253-269.

Bekibele CO, Ogunbiyi J. 2002. Inflammatory orbital pseudotumor simulating retinoblastoma in a one year old girl. *World J Gastroenterol* Jun; 8:3:423-425.

Bell JC, Garson KA. 2002. Oncolytic viruses: programmable tumor hunters. *Crit. Rev Oral Biol Med* 13:1:51-61.

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

Berezutskaya E, Bagchi S. 1997 **a**. The human papillomavirus E7 oncoprotein functionally interacts with the S4 subunit of the 26S proteasome. *J Biol Chem* 272:48:30135-30140.

Berezutskaya E, Yu B, Morozou A, Raychaudhuri P, Bayachi S. 1997 **b**. Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 protein. *Cell Growth Differ* 8:12:1277-1286.

Berumen J, Leonora C, Segura E. 1994. Genome amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E6 genes. *Int J Cancer* 56:640-645.

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

***M en BE Miguel Macías Vega***

Blanquet V, Turleau C, Gross-Morand MS, Sénamaud-Beaufort C, Doz F, Besmond C. 1995. Spectrum of germline mutations in the *RB1* gene: a study of 232 patients with hereditary and non hereditary retinoblastoma. *Hum Mol Genet* 4:383-388.

Blanquet V, Turleau C, Gross M. 1993. Identification of germline mutations in the *RB1* gene by denaturant gradient gel electrophoresis and polymerase chain reaction direct sequencing. *Hum Mol Genet* 2:975-979.

Bookstein R, Lee EY-HP, To H, Young L-J, Sery TW, Hayes RC, Friedmann T, Lee W-H. 1988. Human retinoblastoma susceptibility gene: Genomic organization and analysis of heterozygous intragenic deletion mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:2210-2214.

Calzone L, Gelay A, Zinovyev A, Radvanyi F. 2008. A comprehensive modular map of molecular interactions in RB/E2F pathway. *Molecular Systems Biology*. 4:173.

Canhoto A, Chestukhin A, Libuchick L, De Caprio A. 2000. Phosphorylation of the retinoblastoma-related protein 913 in growth-arrested cells. *Oncogene* 19:44:5116-5122.

Carbone M. 1996. SV40-like sequences in human bone tumors. *Oncogene* 13:527-535.

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

Caron de Fromentel C, Soussi T. 1992. TP53 tumor suppressor gene: a model of investigation in human mutagenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 4:1-15.

Chibon F, Mairal A, Fréneaux P, Terrier P, Coindre J-M, Sastre X, Aurias A. 2000. The *RB1* gene is the target of chromosome 13 deletions in malignant Fibrous Histiocytoma. *Cancer Research* 60:22:6339-6345.

Choy KW, Pang CP, Yu CBO, Wong HL, NG JSK, Fan DSP, Lo KW, Chai JTY, Wang J, Fu W, Lam DSC. 2002. Loss of heterozygosity and mutations are the major mechanisms

of *RB1* gene inactivation in Chinese with sporadic retinoblastoma. Hum Mut in Brief #548 Online.

Chu C-H, Trapnell BC, Curristin S, Cutting GR, Crystal RG. 1993. Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. Nat Genet 3:151-156.

Charles S, Mott Prize. 1987. Papillomaviruses in Human Cancer. Cancer May; 15:1692-1696.

Cowell J. 1991. The genetics of RB. Br J Cancer 63:333-336.

Cowell J K, Smith T and Bia B. 1994. 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.

Cowell JK, Bia B. 1998. A novel missense mutation in patients from a retinoblastoma pedigree showing only mild expression of the tumor phenotype. Oncogene 16:3211-3213.

Darnell J. 2000. Molecular Cell Biology 4<sup>th</sup> Freeman and Co. New York Ed. Médica Panamericana.

DeVoti J, Steinberg B, Rosenthal D, Hatam L, Vambutas A, Allan L. 2004. Failure of Gamma Interferon but Not Interleukin-10 Expression in Response to Human Papillomavirus Type 11E6 Protein in Respiratory Papillomatosis. Clin and Diagnos Lab Immunol. 11:3:538-547.

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

Dick FD, Dyson NS. 2002. Three regions of the pRB pocket domain affect its inactivation by human papillomavirus E7 proteins. J Med Genet 76:12:6224-6234.

*M en BE Miguel Macías Vega*

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

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

Dyer Michael A and Bremmer Rod. 2005. The search for the retinoblastoma cell of origin. *Nature Reviews Cancer* 5:91-101.

Dyson N, Howley P, Münger K, Harlow E. 1989. The human papilloma Virus-16 E7 Oncoprotein is able to bind to the RB gene product. *Science* 243:934-940.

Eijiro Wakasugi, Tetsuro Kobayashi, Yasuhiro Tamaki. 1997. Analysis of phosphorylation of pRB and its regulatory proteins in breast cancer. *J Clin Pathol* 50:407-412.

Emery & Rimon's. Retinoblastome. 1997. Principles & Practics of Medical Genetics. 3<sup>a</sup> ed. II Churchill Livingstone.USA.

Francke U. 1976. Retinoblastoma and chromosome 13. *Cytogenet Cell Genet.* 16:131-134.

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

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

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

Gallie BL, Campbell CH, Devlin H, Ducket A, Squire JA. 1999. Development basis of retinal-specific induction of cancer by RB mutation. *Cancer Res.* 59:1731-1735.

***M en BE Miguel Macías Vega***

González Garay ML. 1998. Prevalence in two Mexican cities of Human Papilloma virus DNA sequences in cervical cancer. *Rev Invest Clin* 44:491-499.

Gonzales L S, Stremlau M, He X, Basile J, Münger K. 2001. Degradation of the Retinoblastoma Tumor Suppressor by the Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncoprotein Is Important for functional Inactivation and is Separable from Proteasomal Degradation of E7. *J Virol* 75:16:7583-7591.

Griffiths Anthony J. F. *An introduction to Genetic Analysis*. 7<sup>th</sup> ed. W. H. Freeman and Co. U.S.A. 2000: 307-324.

Hamel PA, Montgomery Gill, Phillips RA, Gallie BL. 1992. Transcriptional repression of the E-2 containing promoters E1aE, c-myc and RB1 by the product of the *RB1* gene. *Molecular and cellular Biology* Aug; 12:8:3431-3438.

Harbour William. 2001. Molecular basis of low-penetrance Retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* Nov; 119:1699-1704.

Harbour JW. 1998. Overview of *RB1* gene mutations in patients with retinoblastoma: implications for clinical genetic screening. *Ophtalmology* 105:1442-1447.

Hatta Y, Koeffler HP. 2002. Role of tumor supresor genes in the development of adult T cell leukemia/lymphoma. *Cancer Res* Jun; 62:11:3200-6.

Hernández AM, Lazcano PEC, Berumen CJ, Cruz VA, Alonso de Ruiz P, González G. 1997. Human Papilloma virus 16-18 infection and cervical cancer in Mexico: A case control study. *Arch Med Res* 7:209-214.

Helt Anna-Maria and Galloway Denise A. 2003. Mechanisms by which DNA tumor virus oncoproteins target the Rb family of pocket proteins. *Carcinogenesis* 24:2:159-169.

Hogan B, Constantini F, Lacy E. 1986. Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. M. pp. 332.

Hogg A, Britta B, Zerrin O, Cowell JK. 1993. Molecular mechanisms of oncogenic mutations in tumors from patients with bilateral and unilateral retinoblastoma. Proc. Natl Acad Sci 90:7351-7355.

Hollinsworth R, Carmel E, Wen-Hwa L. 1993. RB protein and the cell cycle. Current Opinion in Genetic and development. 3:55-62.

Honglin S, Ramus S, Shadforth D. 2006. Common variants in *RB1* gene and risk of invasive ovarian cancer. Cancer res 66:20:10220-26.

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

Howley Peter M. 1991. Fundamental virology. 2° ed. B. N. Fields, D.M. Knipe Raven Press Ltd. New York. 743-765.

Ikeda H, Beauchamp R, Yashimoto T, Yandell DW. 2002. Detection of heterozygous mutation in the retinoblastoma gene in a Human Pituitary Adenoma using PCR-SSCP analysis and direct sequencing. Curr Gene Ther May; 2:2:243-54.

John Cairns. 2000. The interface between molecular biology and cancer research. Mutation Research 462:423-428.

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

Joseph B, Shanmugam MP, Srinivasan MK and Kumaramanickavel. 2004. Retinoblastoma: genetic testing versus conventional clinical screening in India. Mol Diag 8:237-243.



Kari Hemminki, Pertti Mutanen. 2001. Genetic epidemiology of multistage carcinogenesis. *Mutation Research*.473:11-21.

Karlsen F. 1996. Use of multiple PCR primers sets of optimal detection of Human Papilloma virus. *J Clin Microbiol* 34:2095-2100.

Kato MV, Ishizaki K, Ejima Y, Kaneko A, Tanoka H, Sasaki MS. 1993. Loss of heterozygosity on chromosome 13 and its association with delayed growth of retinoblastoma. *Int J Cancer* 54:922-926.

Kato MV, Ishizaki K, Shimizu T, Togushida J, Kaneko A, Sasaki MS. 1995. Delayed development of retinoblastoma associated with loss of a maternal allele on chromosome 13. *Int J Cancer* 64:3-8.

Kato MV, Shimizu T, Nagayoshi M, Kaneko A, Sasaki MS, Ikawa Y. 1996. Genomic imprinting of the human serotonin-receptor (HTR2) gene involved in development of retinoblastoma. *Am J Hum Genet* 59:1084-1090.

Kevin M. 1996. A rapid and efficient method for DNA extraction from paraffin wax embedded tissue for PCR amplification. *J Clin Pathol* 49:M179-M180.

Kevin N, Douglas C. 1996. Domains A and B in the Rb pocket interact to form a transcriptional repressor motif. *Molecular and cellular Biology* 16:4862-4868.

Knudson AG. 2002. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Oncogene* Feb; 21:10:1510-1517.

Knudson A. 1996. Hereditary Cancer: two hits revisited. *J. Cancer Res Clin Oncol* 122:3:135-40.

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

Kumaramanickavel G, Joseph B, Narayana K, Natesh S, Mamatha G, Shanmugam M. 2003. Molecular-genetic analysis of two cases with retinoblastoma: benefits for disease management. *J Genet* 82:39-44.

Latil A, Bieche I, Pesche S, Volant A, Valeri A, Fournier G, Cussenot O, Lidereau R. 1999. Loss of heterozygosity at chromosome arm 13q and *RB1* status in human Prostate Cancer. *Human Pathology* 30:7:809-815.

Leal-Leal C, Flores-Rojo M, Medina-Sansón A, Cerecedo-Díaz F. 2004. A multicentre report from the Mexican Retinoblastoma Group. *Br. J. Ophthalmol* 88:1074-75.

Leal-Leal CA, Rivera-Luna R, Flores-Rojo M. 2006. Survival in extra orbital metastatic retinoblastoma: treatment results. *Clin Transl Oncol* 8:1:39-44.

Lee JO, Russo A, Pauletich NP. 1998. Structure of the retinoblastoma tumour suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. *Nature* 26:391:859-65.

Lefevre SH, Chauveine L. 2002. AT to C mutation in the polypyrimidine tract of the exon G splicing site of the RB gene responsible for low penetrance hereditary retinoblastoma. *Tohoku J Exp Med Mar* 196:3:193-201.

Lei Zheng, We-Hwa Lee. 2001. The Retinoblastoma gene a prototypic and multifunctional tumor suppressor. *Experimental Cell Res* 264:2-18.

Lesueur F., Song H., Ahmed S., Luccarini C., Jordan C., Luben R., Easton D.F. Dunning A.M. 2006. Single-nucleotide polymorphisms in the RB1 gene and association with breast cancer in the British population. *British J. Cancer.* 94:1921-1926.

Lih-Jiuan S, Eva Y, Hoang To. 1988. Human esterase D gene: complete cDNA sequence, genomic structure and applications in the genetic diagnosis of human retinoblastoma. *Hum Genet* 79:137-141.

Liu Z, Song Y, Bia B, Cowell JK. 1995. Germline mutations in the *RB1* gene in patients with hereditary retinoblastoma. *Genes Chrom Can* 14:4:277-284.

Livesey FJ, Cepko CL. 2001. Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina. *Nature Rev Neurosci* 2:109-118.

Lohmann D. R. Brandt B, Höpping W, Passarge E. and Horstemke B. 1994a Spectrum of small length germline mutations in the *RB1* gene, *Hum Mol Genet* 3:2187-2193.

Lohmann D, Brandt R, Hopping W. 1994b. Distinct *RB1* gene mutations with low penetrance in Hereditary retinoblastoma. *Hum Genet* 94:4:349-54.

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

Lohmann D, Martin G, Birgit B. 1997. Constitutional *RB1*-gene mutations in patients with isolated unilateral retinoblastoma. *Am J Hum Genet.* 61:282-294.

Lowy DR. 1989. Clinical perspective-Papillomavirus Infection. *Cancer Cells* 7/Molecular Diagnostics of Human Cancer Col. Spring Harbor Laboratory. 183-185.

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

Macías M, Dean M, Atkinson A, Chavez M, Orozco L. 2008. Spectrum of *RB1* gene mutations and loss of heterozygosity in Mexican patients with retinoblastoma: Identification of six novel mutations. *Cancer Biomarkers* 4:93-99.

McGee TL, Cowley GS, Yandell DW, Dryja TP. 1990. Detection of the XbaI RFLP within the retinoblastoma locus by PCR. *Nucleic Acids Res* 18:207.

Mcgee T, Yandell D, Dryja T. 1989. Structure and partial genomic sequence of the human retinoblastoma susceptibility gene. *Gene* 1980:119-128.

Maniatis T, Sambrook. 1989. *Molecular Cloning, a laboratory manual*. VII 2° ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA pp.7.87.

Manos M. 1989. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papilloma virus. *Cancer cells* 7:209-214.

Marie Classon, Nicolas Dyson. 2001. p107 and p130: Versatile proteins with Interesting pockets. *Experimental Cell Research* 264:135-147.

Martín N, Coll HD, García J. 2001. Retinoblastoma. *Annals d' Oftalmología*.9:2:74-92.

Mastrangelo D, De Francesco S, Di Leonardo A, Lentini L. 2007. Retinoblastoma epidemiology: does the evidence matter?. *Eur J Cancer* 43:1596-1603.

Mateu E, Sánchez F, Najera C, Beneyto M, Castell V, Hernández M, Serra I, Prieto F. 1997. Genetics of retinoblastoma: a study. *Cancer Genet Cytogenet* 95:40-50.

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

Moshe Oren. 2001. Tumor Suppressor Perspective. *Experimental Cell Res* 264:1.

Munger H. 2002. The role of human papillomavirus in human cancer. *Oncogene* Feb; 21:8:1245-8.

Munger Karl. 1995. The molecular biology of cervical cancer. *Journal of Cell Biochem* 23:55-60.

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

Nigg Erich. 2002. Centrosome aberrations: Cause or consequence of cancer progression?. *Nature reviews Cancer* 2:1-11.

Norck M, Terry L, Imanshu M. 1995. Retinoblastoma. Cell of origin. *Arch Ophthalmol* 113:791-802.

O'Connor DP, Kay EW, Leader M, Murphy GM, Atkins GJ, Mabruk MJEMF. 2001. A high degree of chromosomal instability at 13q14 in cutaneous squamous cell carcinomas: indication for a role of a tumour suppressor gene other than Rb. *J Clin Pathol:Mol Pathol* 54:165-169.

Ohtani-Fujita H, Fujita T, Aoike A, Osifchin N. E. 1993. CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Oncogene* 8:1063-1067.

Onadim Z, Cowell JK. 1991. Application of PCR amplification of DNA from paraffin embedded tissue sections to linkage analysis in familial retinoblastoma. *J Med Genet* 28:312-316.

Onadim Z, Hogg A, Baird PN, Cowell JK. 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.

Orjuela M, Irene O, Maria D. 2001. Alterations of the cell cycle regulators affecting the RB pathway in nonfamilial retinoblastoma. *Human Pathology* 32:5:537-544.

Orjuela M, Ponce V, Ridaura C. 2000. Presence of the Human Papilloma Virus in tumor tissue from children with retinoblastoma: An alternative mechanism for tumor development. *Clinical Cancer Research* Oct; 6:4010-4016.

Orozco L, Chávez M, Saldaña Y, Velázquez R, Carnevale A, González-del Angel A, Jiménez S. 2006. Cystic fibrosis: molecular update and clinical implications. *Rev Invest Clin* 58:2:139-52.

*M en BE Miguel Macías Vega*

Otterson GA, Chen WD, Coxon AB, Khleif SN, Kaye FJ. 1997. Incomplete penetrance of familial retinoblastoma linked to germ-line mutations that result in partial loss of RB function. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:12036-12040.

Palazzi, MA; Yunes, JA; Cardinalli, IA; Stangenhuis, GP; Brandalise, SR; Ferreira, SA; Sobrinho, J.S.P. and Villa, LL. 2003. Detection of oncogenic human papillomavirus in sporadic retinoblastoma, *Acta Ophthalmol Scand* 81:396–398.

Perri P, Longo L, Mc Conville. 2002. Linkage analysis in families with recurrent neuroblastoma. *West Afr. Med.* Jan-Mar, 21:1:77-8.

Peter DA. 2001. Regulation of the retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin/cdks. *Biochimica et Biophysica Acta* 1471:M123-M133.

Pier PC, Tonini T and Giordano A. 2002. The retinoblastoma family: twins or distant cousins? *Genome Biology* 3:9:3012.1-3012.9.

Premoli G, González A, Villareal J, Percoco T, Pietrocino P. 2005. Virus del Papiloma Humano; visión actual en biomédicina. *62:6:213-224.*

Raizis A, Clemett R, Corbett R, McGaughran J, Evans J and George P. 2002. Improved clinical management of retinoblastoma through gene testing. *N Z Med J* 115:231-234.

Richter S, Vandezande K, Chen N, Zhang K, Sutherland J, Anderson J, Han L, Panton R, Branco P and Gallie P. Sensitive and efficient detection of RB1 gene mutations enhances care for families with retinoblastoma. *Am J Hum Genet* 72:253-269.

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

Rodríguez M, Salcedo M, González M, Coral-Vazquez R, Salamanca F, Arenas D. 2002. Identification of novel mutations in the *RB1* gene in Mexican patients with retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 138:27-31.

Rojo P, Martín M, Mendoza A. 2001. Papilomatosis respiratoria recurrente: una causa de dificultad respiratoria progresiva. *Anales españoles de Pediatría* 55:558-560.

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

Sasaki O, Meguro K, Tohmiya Y. 2002. Nucleotide alteration of retinoblastoma protein-interacting zinc finger gene RB in human leukemia. *JAAPOS Apr*; 6:2:108-111.

Satoshi Ashizawa, Hiroko Nishizawa. 2001. Collective Inhibition of pRB family proteins by phosphorylation in cells with p16<sup>INK4a</sup> loss or cyclin E overexpression. 276:14:11362-11370.

Sauter ER, You U. 2002. Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma. *Oncogene May*; 13:21:3475-95.

Scheffer H, te Herman G, Ruize Y. 1989. Lineage analysis of families with hereditary RB: Non penetrance of mutation, revealed by combined use of markers within and flanking the RB1 gene 45:252-260.

Scholes AGM, Lologlou T, Maloney P, Hagan S, Nunn J, Hiscott P, Damato BE, Grierson I, Field JK. 2001. Loss of Heterozygosity on chromosomes 3, 9, 13 and 17, including the Retinoblastoma locus, in Uveal Melanoma. *Invest Ophthalmol & Visual Science Oct*; 42:11:2472-2477.

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

Shirodkar S, Ewen M, De Caprio 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.

Sivakumaran T A, Shen P, Wall DP, Do BH, Kucheria K and OefnerPJ. 2005 Conservation of the RB1 gene in human and primates. Hum Mut.25:396-409.

Stiller CA, Parkin DM. 1996. Geographic and ethnic variation in the incidence of childhood cancer. British Med Bol 52: 682-703.

Syrjänen KJ. 2003. HPV infections in benign and malignant sinonasal lesions. J Clin Pathol. 56:174-181.

Szepe M, Dahlgren L, Leena-Maija A, Öhd J, Kanter-Lewenshon L, Dahlstrand H, Munck-Wikland E, Grandér D and Dalianis T. 2005. Human papillomavirus, viral load and proliferation rate in recurrent respiratory papillomatosis in response to alpha interferon treatment. J Gen Virol. 86:1695-1702.

Thonney F, Munier F, Balmar A. 1996. Le retinoblastome: aspects cliniques et diagnostic moleculaire. Schweiz-Rundsch-Med-Prax. 85:35:1058-62.

Todd R, Hinds PW, Hunger K, Rustgia K, Opitz O. 2002. Cell cycle dysregulation in oral cancer. Ann NY Acad Sci. Jun;9:63:74-84.

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

Tucker T, Friedma JM. 2002. Pathogenesis of hereditary tumors: beyond the “two-hit” hypothesis. Clinical Genetics 62:5:345-357.

Valverde José R, Alonso J, Palacios I, Pestaña A. 2005. *RB1* gene mutation up-date, a meta-analysis based on 932 reported mutations available in a searchable database. BMC Genetics. 6:53 <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/6/53>.

Venüs O, Briollais L, Knight J. 2006. SNP-SNP interactions in breast cancer susceptibility. BMC Cancer 6:114-29.



- Vousden KH, Farrel PJ. 1994. Viruses and Human cancer. *British Med Bol* 50:3:560-581.
- Wada T, Louhelainen J, Hemminki K, Adolfsson J, Wijkstrom H, Norming U, Borgstrom E, Hansson J. 2000. Bladder Cancer: Allelic deletions at and around the retinoblastoma tumor suppressor gene in relation to stage and grade. *Clinical Cancer Research* 6:610-615.
- Wang LT. 1996. Nested PCR-SSCP assay for the detection of p53 mutations in paraffin wax embedded bone tumours: improvement of sensitivity and fidelity. *J Clin Pathol:Mol Pathol.* 49:M176-M178.
- Weatherall D. 1991. "The new genetics and clinical practice" 3<sup>a</sup> ed. Oxford University Press, Oxford. pp. 376.
- Weinberg R. 1991. Tumor supressor genes. *Science* 254:1138-1146.
- Wiest T, Schwarz E. 2002. Involvement of interact HP16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRB cell cycle control. *F Ned Tijdschr Geneeskd.* 146:8:345-50.
- Wiggs J, Nordenskjöld M, Yandell D, Rapaport J, Grondin V, Janson M, Werelius B, Petersen R, Craft A, Riedel K, Liberfarb R, Walton D, Wilson W, Dryja TP. 1988. Prediction of the risk of hereditary retinoblastoma, using DNA polymorphisms within the retinoblastoma gene. *New Eng J Med* 318:151-157.
- Xue Q, Sand T, Kashiwabara K. 2002. Aberrant expresión of pRB, and p16 p14ARF, MDM2, p21, and p53 in stage 1 adenocarcinomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:4:358-67.
- Yandell D, Dryja T. 1989. Sequencing of alleles at the Human Retinoblastoma Locus: Application to Cancer Diagnosis and Genetic Counseling. en: "Molecular Diagnostics of Human Cancer". *Cancer Cells.* Cold Spring Harbor Laboratory. Massachusetts USA. pp.223-227.

Yandell DW, Campbell TA, Dayton SH, Petersen R, Walton D, Little JB, McConkie-Rosell A, Buckley EG, Dryja TP. 1989. Oncogenic point mutations in the human retinoblastoma gene: their application to genetic counseling. *N Eng J Med* 321:1689-1695.

Yilmaz S, Horsthemke B, Lohmann DR. 1998. Twelve Novel RB1 gene mutations in patients with hereditary Retinoblastoma. *Hum Mutat: Mutation in Brief #206* On line.

Yoshikawa H. 1990. Detection and typing of multiple HPV's. *Int J Cancer* 45:990-992.

Yunis JJ, Ramsey N. 1978. Retinoblastoma and subband deletion of chromosome 13. *Am. J Dis Child* 132:161-163.

Zaoxia L, Yue S, Britta B. 1995. Germline mutations in the RB1 gene in patients with hereditary retinoblastoma. *Genes, Chromosomes & Cancer* 14:277-284.

Zhou Y, Gauss L. 2002. Tumor suppressor gene p16 and RB expresión in gastric cardia precancerous lesions from subjects at a high incidence area in northern China. *Leukemia*. 16:6:1069.85.

Zhu X, Dunn JM, Goddard AD, Squire JA, Becker A, Phillips RA, Gallie BL. 1992. Mechanisms of loss of heterozygosity in retinoblastoma. *Cytogenet Cell Genet* 59:248-252.

Zur Hausen H. 1996. Papillomavirus infections a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1288:F55-F78.

PAGINAS WEB

<http://cancernet.nci.nih.gov> – Contiene una base de datos bibliográfica CANCERLIT, información sobre tratamiento del cáncer, diagnóstico prevención, genética, cuidados y aspectos clínicos.

<http://www.cancertrials.nci.nih.gov> – Contiene información sobre nuevos descubrimientos, revistas de investigación y otras fuentes.

<http://ncbi.nlm.nih.gov/disease/Retinoblastoma.html> - Contiene información oficial sobre el retinoblastoma.

<http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/E6> - Extensión de portal, contiene información sobre el Virus Papiloma Humano.

[http://www.txccc.org/diseases/retino/retino\\_main.html](http://www.txccc.org/diseases/retino/retino_main.html) - Sitio de información del Retinoblastoma Center at the Texas Children's Cancer Center.

<http://www.expertreviews.org03005520h.htm> - Información específica sobre el retinoblastoma.

<http://www.d-lohmann.de/Rb/mutations.html> - Registro de mutaciones en el gen *RB1*.

[www.med\\_ars.it/galleries/virus\\_9.htm](http://www.med_ars.it/galleries/virus_9.htm). – Imágenes de virus papiloma.

## **ANEXO I.- Extracción y Purificación del DNA.**

### **Extracción de DNA de sangre periférica**

Se tomaron de 7 a 10 ml de sangre periférica de cada paciente usando EDTA como anticoagulante. La muestra se centrifugó durante 20 minutos a 3000 rpm, el plasma y los eritrocitos se desecharon, la capa de linfocitos se separó y se colocó en 3 ml de solución para lisis de eritrocitos (RCBL), se agitó suavemente y se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm. El sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió en 3 ml de RCBL, se agitó suavemente y se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm. Este paso se repitió hasta eliminar toda la hemoglobina. Finalmente el botón de linfocitos se resuspendió en 333  $\mu$ l de RCBL con 1.5 ml de solución para lisis de linfocitos (WCBL) y se incubó toda la noche a 42 °C para obtener un hidrolizado de linfocitos.

### **Purificación del DNA**

El DNA se purificó siguiendo las indicaciones del Kit comercial (Qiagen) de la siguiente manera:

Al hidrolizado obtenido en el paso anterior se agregó 1 ml de solución de precipitación de proteínas, la mezcla se agitó por 10 minutos y se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm, después la fase superior se pasó, a un tubo limpio y se agregaron 5 ml de isopropanol grado molecular, se agitó suavemente hasta que el DNA precipitó y se le extrajo de la solución con una pipeta Pasteur sellada. Se secó por unos minutos a temperatura ambiente, se enjuagó en etanol al 70% se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 200  $\mu$ l de agua destilada estéril.

### **Extracción de DNA de tejido en parafina**

1. - De cada bloque se hicieron cortes de 2  $\mu$  y se lavaron dos veces con xileno para remover la parafina.
2. - Se centrifugaron los tejidos 3 minutos en micro centrífuga a toda velocidad
3. - Se removió el xileno con pipeta, y se repitieron los pasos 1, 2, y 3.
4. - Se agregaron 0.5 ml de alcohol al 100% y se repitió a partir del paso 2.
5. - Se agregó una gota de acetona y se secaron las muestras al vacío hasta eliminar el etanol y la acetona completamente.
6. - Los tejidos se incubaron toda la noche a 37 °C con 100  $\mu$ l de buffer de

digestión que contenía 200  $\mu$ l de proteinasa K.

7. - Se inactivó la proteinasa K incubando los tejidos durante 5 minutos a 94 °C.
8. - Se centrifugó 30 segundos en micro centrifuga y se guardaron las muestras a -20 °C (Kevin Morgan, 1996; Wang 1996).
9. - Para las reacciones de PCR se utilizaron 10  $\mu$ l de cada sobrenadante.

### **Extracción de DNA de tejido tumoral incluido en alcohol al 70 %**

1. - Se realizaron cortes de tejido tumoral de aproximadamente 20  $\mu$  de espesor y se colocaron en un tubo ependorff de 0.6 ml.
2. - Se agregaron 300  $\mu$ l de alcohol absoluto a – 20 °C, se agitó suavemente durante 3 minutos y se centrifugó durante 1 minuto a 14,000 rpm a 5 °C, posteriormente se desechó el sobrenadante y se dejó secar el alcohol durante 30 segundos colocando boca abajo el tubo.
- 3.- Se agregaron 250  $\mu$ l de acetona, se agitó suavemente durante 3 minutos y después se centrifugó durante 1 minuto a 14,000 rpm a 5 °C, se desechó el sobrenadante y se dejó secar la acetona durante 30 segundos colocando boca abajo el tubo.
4. - Se agregaron 200  $\mu$ l de acetona, se agitó suavemente y se dejó evaporar la acetona a 60 °C hasta que el tejido adquirió un color blanquecino (aproximadamente 3 minutos).
5. - Se agregaron 200  $\mu$ l de buffer para lisis de linfocitos y se dejó incubar durante 24 h a 42 °C, la purificación y la cuantificación se realizaron del mismo modo que para el DNA de sangre periférica y al final se guardó a –70 °C durante 24 h en alcohol absoluto, posteriormente se eliminó el alcohol y se resuspendió el DNA en 20 $\mu$ l de agua destilada estéril (Wang, 1996).

### **Extracción de DNA de líneas celulares HeLa y CaKi positivas a VPH**

- 1.– Se utilizó una placa de cultivo S-100 de cada línea celular a su máxima confluencia.
- 2.– La capa celular se resuspendió mediante 3 enjuagues con el mismo medio de cultivo, con buffer de lisis de células rojas (RCLB), se agitó suavemente y se transfirió a dos tubos de ensayo de 10 ml, se centrifugó por 2 minutos a 2500 rpm.
- 3.– Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 2 ml de solución de lisis de células blancas (WCLB), se agitó con vortex durante 30 segundos y se incubó durante 3 h

a 42 °C; la purificación y cuantificación se realizaron de la misma manera que para el DNA de sangre periférica.

### **Cuantificación del DNA**

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

$$(D.O._{260nm}) (F) (dil) = [DNA] \mu g/\mu l.$$

Donde :

D.O.<sub>260</sub> = densidad óptica a una  $\lambda$  de 260 nm.

F = constante equivalente a 0.05 (50 ng de DNA = 1 D.O.<sub>260</sub> nm).

Dil = volumen de dilución equivalente a 250 µl.

### **Evaluación de la integridad del DNA**

Después de la extracción del DNA se comprobó su integridad por medio de una electroforesis para lo cual se mezcló 1µl de muestra con 2µl de colorante azul de bromofenol-xilencianol (0.05 %: 0.05%) y 5µl de agua estéril. Se corrió en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio por 20 minutos a 100 volts. En todos los casos se consideró como DNA de calidad óptima aquel que se encontraba formando una banda gruesa y nítida localizada por arriba de la posición del fragmento de mayor tamaño del marcador de pesos moleculares.

## **ANEXO II.- Preparación de productos para secuenciación.**

### **a) Purificación de productos de PCR para secuenciación.**

- 1.- Se mezclaron 50  $\mu$ l del producto de PCR con 500  $\mu$ l de buffer PB y la solución obtenida se colocó en una columna con un sustrato de alta afinidad por el DNA.
- 2.- La columna se colocó en una camisa especial y se centrifugó 60 segundos a máxima velocidad en una micro centrifuga a 4 °C.
- 3.- Se desechó el eluido obtenido en la camisa de la columna.
- 4.- Se agregaron 750  $\mu$ l de buffer PE a la columna y se centrifugó 60 segundos como en el paso 2, el eluido obtenido se desechó.
- 5.- La columna se colocó en un tubo eppendorf de 1.5  $\mu$ l estéril y el DNA se recuperó de la columna después de colocar en ésta 50  $\mu$ l de agua di-destilada estéril seguido de una centrifugación a máxima velocidad durante 60 seg.

### **b) Reacción de secuenciación**

Para la caracterización de los polimorfismos y mutaciones se secuenció el amplicón obtenido en los pasos anteriores utilizando el kit comercial Big Dye Terminators v.1.1.1 Cycle Sequencing Kit de Applied Biosystems. La mezcla de reacción para secuenciación se preparó de la siguiente manera:

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Terminator Ready Reaction Mix *	8 $\mu$ l
DNA	3 a 10 ng / $\mu$ l
Primer	3.2 pmol
H <sub>2</sub> O desionizada	cbp 20 ml

\* El Terminator Ready Reaction Mix contiene: dNTPs, ddNTPs, AmpliTaq DNA polimerase, MgCl<sub>2</sub>, Buffer Tris-HCl. Se utilizó el siguiente protocolo:

Desnaturalización	96 °C	10 seg
-------------------	-------	--------

***M en BE Miguel Macías Vega***

Alineación	50 °C	5 seg	25 ciclos
Extensión	60 °C	4 min	

Retener a 4 °C.

La calidad de los productos de la reacción de PCR se valoró en geles de agarosa al 1% considerando el tamaño correcto y la intensidad de la señal del producto de PCR. El siguiente paso consistió en purificar los productos de PCR con la enzima ExoSAP-IT siguiendo las instrucciones del fabricante y precipitando el DNA con etanol al 80% y acetato de sodio/EDTA en la placa de muestras que se colocó más tarde en el secuenciador.

Una vez resuspendido el DNA, se adicionaron 15 ul de HIDI Formamida a cada muestra y se centrifugó para combinar el DNA con la formamida, la placa con las muestras se colocó en el termociclador y se desnaturalizaron las muestras por 2 minutos a 95 °C, finalmente se ensambló la placa con los adaptadores necesarios para colocarse en la cámara del secuenciador y se cocó en el equipo ya listo para secuenciar. Finalmente los productos de secuenciación se procesaron con el programa Software Sequencing Analysis hasta obtener la versión impresa.



### **ANEXO III.- CLONACIÓN DE LAS SONDAS PARA HIBRIDACIÓN *IN SITU* .**

#### **Preparación de células competentes DH5- $\alpha$ para clonar y sintetizar las sondas de mRNA para RB1 y E6/E7**

- 1.- Precultivo: 50  $\mu$ l de la cepa DH5- $\alpha$  a transformar se cultivaron toda la noche a 37 ° C en 5 ml de medio SOB complementado con 10 mM de Mg SO<sub>4</sub>.
- 2.- Se inocularon 500  $\mu$ l del precultivo en 50 ml de medio SOB complementado con 10 mM de Mg SO<sub>4</sub> y se incubaron a 37 ° C con agitación moderada hasta una D.O. de 550nm.
- 3.- Se transfirió el cultivo a tubos Falcon estériles, y se colocaron en hielo por 10 minutos.
- 4.- Se centrifugaron por 12 minutos a 4 ° C y 2500 rpm.
- 5.- Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 16 ml de buffer RF1 y se incubó por 15 minutos en hielo.
- 6.- Se centrifugó por 12 minutos a 4 ° C y 2500 rpm.
- 7.- Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 4 ml de buffer RF2 y se incubó por 15 minutos en hielo.
- 8.- Se distribuyeron en volúmenes de 200  $\mu$ l en tubos estériles pre-enfriados y se congelaron a -80 ° C.

#### **Transformación de células con los plásmidos pGEM-4Z/Rb, pGEM-2Z/Myc y SK+/E6/E7 y selección de las cepas transformadas.**

- 1.- Se colocaron 10 ng de plásmido en 200  $\mu$ l de bacterias competentes y se incubaron en hielo durante 20 minutos y a 42 ° C durante 1.5 minutos
- 2.- Se agregaron 800  $\mu$ l de medio SOC y se incubaron en hielo por 2 minutos.
- 3.- Se incubaron 45 minutos a 37 ° C con agitación moderada
- 4.- Se centrifugaron a 15000 rpm / 5 minutos, el sobrenadante se desechó y las bacterias se resuspendieron en el sobrenadante que quedó después del paso anterior.

***M en BE Miguel Macías Vega***

- 5.- Después de resuspender las bacterias, se colocaron en cajas petri con medio Luria/ampicilina, se extendieron con rodillo y se cultivaron a 37 ° C toda la noche.
- 6.-De los cultivos del paso anterior se seleccionaron cuatro clonas aisladas, se tomó cada una con un palillo estéril y se picó en otra caja con medio Luria/ampicilina para preservar únicamente las clonas transformadas.
- 7.- El palillo utilizado en el paso anterior se depositó en un tubo para cultivo que contenía 2 ml de medio SOC/ampicilina el cual se cultivó toda la noche a 37 °C con agitación.
- 8.- El cultivo anterior se repartió en dos tubos eppendorf y se centrifugaron a 12000 rpm / 5 m, y se decantaron sobre un papel absorbente.
- 9.- A cada tubo se agregaron 200 µl de TE, se agitaron con vortex, se agregaron 200 µl de TE, se agitaron nuevamente, se incubaron 5 m a temperatura ambiente y 15 m a -70 °C, después se centrifugaron a 10000 rpm/15 minutos a temperatura ambiente
- 10.- Con un palillo estéril se retiró la pastilla del fondo, el sobrenadante contenía el DNA del plásmido
- 11.- Se agregaron 400 µl de PEG20%/NaCl 1 M, se mezclaron cuidadosamente y se incubaron 20 m a temperatura ambiente.
- 12.- Después se centrifugaron a 14000 rpm/3 minutos y se decantó el sobrenadante.
- 13.-Se dió un pulso de centrifugación a cada tubo y se eliminaron los restos de sobrenadante con vacío.
- 14.- Al botón se le agregaron 30 µl de TE (1x), se tomaron 8 µl y se mezclaron 1µl de la enzima de restricción con el buffer apropiado como se indica en los CUADROS 4 y 5, a continuación se incubó 2 h a 37 °C.
- 15.- El DNA plásmidico digerido se corrió en una electroforesis a 120 V/25-30 minutos y se tomó el registro fotográfico correspondiente.
- 16.- Se eligieron las clonas que tenían el plásmido y el gen correspondiente.

**Maxiprep para amplificar las clonas seleccionadas**

- 1.- Se sembró una asada de la clona seleccionada en 5 ml de medio líquido LB/ampicilina durante 3 h a 37 °C (pie de cultivo).
- 2.- Se vació el cultivo en 500 ml de medio LB/ampicilina y se incubó toda la noche a 37 °C con agitación.

- 3.- Las bacterias se empastillaron por centrifugación a 8000 rpm (en rotor JA-10) durante 10 minutos en tubos de 50 ml.
- 4.- Se eliminó el sobrenadante y a la pastilla de células se le agregaron 5 ml de TE y 12.5 ml de PBS, se agitó con vortex, se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente y 10 minutos a -70 °C.
- 5.- Después se centrifugaron 1.5 h a 4 ° C y 22000 rpm (en rotor SW-28).
- 6.- Se retiró el botón de restos bacterianos y al sobrenadante se le agregaron 35ml de PEG-NaCl, se incubó 20 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 7000 rpm (en rotor SW-28) durante 10 minutos.
- 7.- El sobrenadante se decantó y el tubo se colocó de manera invertida sobre un papel absorbente y se colocaron en el tubo 3ml de TE, se homogenizó el botón con movimientos circulares, se tomaron 2 µl, se corrió en un gel para ver la pureza de la muestra, y se corrió en una electroforesis a 80 V.

#### **Purificación de plásmidos por gradiente isopícnico de CsCl**

- 1.- Se colocaron 3 ml de TE (1X) y se homogenizó el botón con movimientos circulares (paso 7 del maxiprep), se agregó 1 g de CsCl por cada ml de TE y se mezcló suavemente invirtiendo el tubo.
- 2.- Se agregaron 800 µl de bromuro de etidio (10 mg/µl)
- 3.- Se llenaron tubos quick-seal de 5.1 ml de polialómero con la solución del paso anterior, los tubos se llenaron hasta el tope y se equilibraron con CsCl, los tubos se equilibraron en una balanza analítica a no más de 0.01 g de diferencia entre los tubos.
- 4.- Los tubos se sellaron minuciosamente con calor y se centrifugaron 2.5 h /9000 rpm (90 K) a 18 °C (en rotor 90 uti o bien 6 h a 20 °C a 55 K en un rotor uti 65.2 en ultra centrifuga).
- 5.- Con ayuda de una lámpara de UV se identificaron las bandas del DNA de plásmido y con una jeringa y aguja se colectó la banda correspondiente al DNA super enrollado.
- 6.- El DNA colectado en la jeringa se pasó a un tubo falcon y para quitar el bromuro de etidio se preparó una solución de H<sub>2</sub>O destilada saturada de cloruro de sodio, la cual posteriormente se mezcló con isopropanol (1:1) mezclando bien ambas soluciones, dejando que la sal se precipitara en el recipiente y tomando la parte superior que corresponde a la solución de interés (isopropanol saturado con cloruro de sodio).

7.- Se colocó un volumen similar de isopropanol saturado con cloruro de sodio con respecto al volumen recolectado del tubo eppendorf repitiendo hasta que el color rosa desapareciera.

8.- Para la diálisis se cortaron los cilindros de las bolsas de diálisis en fragmentos de 10 a 20 cm, se hirvieron por 10 minutos en un vaso de precipitado que contenía 2% P/V de bicarbonato de sodio y 1mM de EDTA pH 8, se lavó el tubo con agua destilada y se hirvió 10 minutos en 1mM de EDTA pH 8, se dejó enfriar un poco el vaso con la solución, se cubrió con un papel aluminio y se dejó a 4 °C.

9.-La fase superior se desechó y la fase inferior se colocó dentro de las bolsas de diálisis cerrando los extremos con pinza closure, se colocó aproximadamente 1ml de la muestra y, se colocaron en un vaso de precipitado con agitador magnético que contenía TE (1X) para que por difusión eliminar el cesio, en el cuarto frío durante aproximadamente 36 h con tres cambios por lo menos de TE (1X).

10.- Posterior a la diálisis se quitó una de las dos pinzas por el extremo más corto, con cuidado se abrió el extremo auxiliándose con los dedos y se introdujo la punta de una pipeta tratando de extraer la mayor cantidad posible de DNA y colocándolo en otro tubo eppendorf previamente etiquetado y se visualizó el DNA en un gel de agarosa al 1%.

### **Linearización de plásmidos**

Se llevó a cabo una reacción de linearización para cada plásmido de acuerdo con los protocolos de restricción indicados en los CUADROS 9 y 10 de manera que se pudieran sintetizar sondas de RNA una con secuencia en sentido 5'—3' y otra con la secuencia en sentido 3'—5' para cada uno de los genomas.

**CUADRO 9.- Protocolo de restricción para la linearización de plásmidos en secuencias 5'—3'.**

PLÁSMIDOS		ENZIMAS		BUFFERS	
pGEM4z/rb	8 µl	Hind III	1 µl	Buffer 2	1 µl
pGEM2Z/myc	8 µl	Eco RI	1 µl	Buffer 3	1 µl
SK+/E6-E7	8 µl	Kpn I	1 µl	Buffer 4	1 µl

**CUADRO 10.- Protocolo de restricción para la linearización de plásmidos en secuencias 3' – 5'.**

PLÁSMIDOS		ENZIMAS		BUFFERS	
pGEM4Z/rb	8 µl	Nar I	1 µl	Buffer 1	1 µl
pGEM2Z/myc	8 µl	Acc I	1 µl	Buffer 1	1 µl
SK+/E6-E7	8 µl	Eco RI	1 µl	Buffer 1	1 µl

Las restricciones se incubaron a 37 °C durante 2 h y después se confirmó la linearización del plásmido en una electroforesis en geles de agarosa al 1% a 120 v por 30 minutos.

### **Precipitación del plásmido linearizado**

***M en BE Miguel Macías Vega***

- 1.- A 9  $\mu\text{l}$  del paso anterior se les agregó 91  $\mu\text{l}$  de TE y 100  $\mu\text{l}$  de una solución 1:1 de fenol-(cloroformo 24: 1 a. isoamílico) y se agitó ligeramente con Vortex
- 2.- Se tomó la fase superior y se colocó en otro tubo eppendorf, adicionándole 100  $\mu\text{l}$  de acetato de amonio 4 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío (-20 °C) con respecto al volumen recolectado.
- 3.- Se centrifugó 30 minutos a 14000 rpm a 4 ° C, extrayendo la fase acuosa con vacío evitando arrastrar el botón
- 4.- Se lavó con etanol al 80 % y se centrifugó en las mismas condiciones anteriores durante 5 minutos.
- 5.- Se extrajo la fase acuosa que contenía el DNA.
- 6.- Se secó a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 7.- Se resuspendió en 10  $\mu\text{l}$  de TE y se guardó a 4 ° C.

**Síntesis y marcaje de sondas de RNAm para HIS por transcripción *in vitro***

- 1.- Se mezclaron los reactivos en el orden indicado en los CUADROS 11 y 12. Se preparó una reacción de transcripción *in vitro* por separado para cada sonda incluyendo los controles de la transcripción CPSPT18 y CPSPT19 que son secuencias ya caracterizadas de los plásmidos pGEM4Z/rb y pGEM2Z/myc respectivamente.
- 2.- Cada una de las reacciones se incubó 2 h a 37 ° C.
- 3.- Se agregaron 2  $\mu\text{l}$  de DNAsa [1 u/ $\mu\text{g}$ ] para eliminar los restos de DNA, se incubó 15 minutos a 37 ° C y se agregaron 2  $\mu\text{l}$  de EDTA 0.2 M
- 4.- Se precipitó el RNA marcado con 2.5  $\mu\text{l}$  de CiLi 4M y 75  $\mu\text{l}$  de etanol -20 ° C.
- 5.- Se incubó toda la noche a - 70° C ó -20 °C.
- 6.- Se centrifugó 30 minutos a 14000 rpm a 4 ° C y el sobrenadante se eliminó con vacío
- 7.- El precipitado se lavó con 50  $\mu\text{l}$  de etanol al 70% a -20 °C sin agitar.
- 8.- Se centrifugó 5 minutos a 14000 rpm a 4 °C.
- 9.- El sobrenadante se eliminó rápidamente con vacío, sin arrastrar la pastilla.
- 10.- Con un pulso de centrifugación se eliminó el exceso con pipeta pasteur y vacío.
- 11.- La pastilla se resuspendió en 50  $\mu\text{l}$  de buffer de almacenamiento para RNA
- 12.- Finalmente las muestras de RNA se guardaron a -20 °C.

**CUADRO 11.- Mezcla de reacción para marcaje de sondas con Secuencias 5' – 3'.**

Reactivos	SONDA	SONDA	SONDA DE CONTROL	SONDA DE CONTROL
	RB	E6 / E7	CPSPT18	CPSPT19
Plasmido linearizado	9 µl	9 µl	9 µl	9 µl
Buffer 10X	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Buffer 5X		4 µl		
dNTP's	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Inhibidor de RNasa	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
7T RNA pol.	-----	-----	2 µl	-----
T3 RNA pol.	-----	2 µl	-----	-----
Sp6 RNA pol.	2 µl	-----	-----	2 µl
H <sub>2</sub> O dd	4 µl	2 µl	4 µl	4 µl

**CUADRO 12.- Mezcla de reacción para marcaje de sondas con Secuencias 3' – 5'.**

Reactivos	SONDA	SONDA	SONDA DE CONTROL	SONDA DE CONTROL
	RB	E6/E7	CPSPT18	CPSPT19
Plasmido linearizado	9 µl	9 µl	9 µl	9 µl
Buffer 10X	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
dNTP's	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Inhibidor de RNasa	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
7T RNA pol.	2 µl	2 µl	2 µl	-----
Sp6 RNA pol.	-----	-----	-----	2 µl
H <sub>2</sub> O dd	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl

### **Confirmación de síntesis y detección inmunológica de las sondas**

- 1.- Se colocó 1 µl de cada sonda en una membrana de nitrocelulosa incluyendo los controles de transcripción *in vitro*
- 2.- La membrana se horneó a 80 ° C por una hora
- 3.- La membrana se colocó durante 5 minutos en una caja petri, se cubrió con TN 1X, y se agitó suavemente.
- 4.- La membrana se colocó en una bolsa de plástico y se le agregaron 5 ml de mezcla de saturación inespecífica (mezcla de bloqueo) al 5%, se selló y se dejó incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
- 5.- Se cambió la mezcla de bloqueo por la dilución 1:5000 del anticuerpo policlonal anti-digoxigenina, sellando los extremos de la bolsa e incubando 1 hora a 37 °C o 2 horas a temperatura ambiente.
- 6.- La membrana se lavó dos veces en trietanolamina (TN) a temperatura ambiente con agitación suave durante 5 minutos cada vez y después 10 minutos con Buffer PBS
- 7.- La membrana se incubó 16 h en presencia de la solución de BCIP/NBT.
- 8.- En este paso se observó una coloración marrón en los puntos correspondientes a las sondas y una ausencia de color en los sitios de los controles de transcripción negativos.
- 9.- La membrana se lavó suavemente con TE, se secó a temperatura ambiente y se guardó en una bolsa seca y sellada para archivo.

### **Hidrólisis de las sondas para hibridación in situ (HIS)**

- 1.- A 20 µl de sonda se agregaron 20 µl de DTT 10 mM, 20 µl de Buffer de BBS/TN 1% y se incubaron a 60 ° C por un tiempo variable denominado X.
- X es dependiente de la longitud original del transcrito y se determina con la siguiente formula :

$$X = \frac{L_o - L_f}{K L_o L_f}$$



Donde : Lo = Longitud original en kb

LF = Longitud final en kb

K = 0.11 (Hogan 1986)

2.- La hidrólisis se neutralizó con 50  $\mu$ l de Buffer PBS/TE y 20  $\mu$ l de acetato de sodio 3M (pH 5.2)

3.- Se precipitó con 500  $\mu$ l de etanol absoluto, se aplicó un pulso de microcentrifuga, se decantó y se secó la pastilla a temperatura ambiente.

4.- La pastilla se disolvió en 60  $\mu$ l de DTT 10 mM a una concentración final de 2-3 ng/ $\mu$ l.

5.- Se confirmaron los tamaños inicial y final del transcrito por electroforesis en agarosa al 2 %.

6.- Se agregó al transcrito un volumen igual de formamida y DTT a una concentración final de 10 mM, este es un Stock de sonda (5X) y se almacenó a  $-20$  °C.

## **PREPARACIÓN DE LOS TEJIDOS PARA HIBRIDACIÓN *IN SITU***

### **Preparación de laminillas con poli D-lisina**

Un grupo de portaobjetos limpio se cubrió con una solución de poli D-lisina al 0.1 % durante 5 minutos a TA, se eliminó el exceso en un papel absorbente y se dejó secar toda la noche a 37 °C.

### **Corte y montaje de tejidos embebidos en parafina**

Con el microtomo se realizaron cortes de cada tejido de 3  $\mu$  de grueso, se adicionó etanol al 70% para que se adhiriera el corte a la superficie del portaobjetos tratado previamente con D-lisina, cuidando que los cortes se hicieran seriados con el fin de poder realizar un análisis secuencial del tejido.

### **Tinción con hematoxilina-eosina**

1.- Las laminillas seleccionadas se hornearon a 65 °C durante 30 minutos y después se colocaron en xilol durante otros 30 minutos.

2.- Las laminillas se hidrataron con etanol al 100, 95, 90, 80, 70, 60, 50, 40 y 30%, y después se pasaron por PBS al 100, 95, 90, 80, 70, 60, 50, 40 y 30%.

3.- Se colocó una gota de hematoxilina de Harris y después se agregó agua amoniacal para virar el color, después se agregó una gota de eosina y se eliminó el exceso con agua bi-destilada.

4.- Las laminillas se enjuagaron con etanol al 70 %.

5.- El tejido se deshidrató en etanol 2 veces al 70 %, una vez al 80, 90, y 100 % finalmente la laminilla se introdujo unos segundos en xilol y se montó la preparación con resina.

### **Desparafinación de tejidos**

1.- Se horneó la muestra fijada en el portaobjetos en una canastilla, durante 16 h, a 60 °C.

2.- Se llevó a cabo un tren de trabajo que consiste de:

xilol al 100% 30 minutos, retirar y repetir con xilol nuevo

lavados en un tren de etanol con gradientes de 100, 95, 80, 70, 60, 50 y 30% por 10 minutos en cada uno y finalmente se lavó con buffer PBS 1X por 10 minutos.

### **Pretratamiento**

Se llevó a cabo un tren en tubos costar de 50 ml, introduciendo los portaobjetos en los tubos durante 3 minutos

3.- Proteinasa K (10 µg/ml en PBS)

4.- PBS 1X

5.- Glicina al 01.2% en PBS

6.- PBS

7.- Trietanolamina (0.1M) + Anhidrido acético (0.25%) en PBS

8.- PBS

9.- Deshidratación con etanol al 30, 70 y 100%

10.- Se secaron durante 1-2 h a temperatura ambiente.

11.- Las laminillas se colocaron en una palangana revestida en su interior con papel absorbente y papel aluminio que sostenía las laminillas, el papel absorbente se empapó con el buffer de formamida (50%)-SSC (0.1%) y 49.9% de H<sub>2</sub>O.

12.- A cada tejido se le colocaron 10 µl de solución pre.hibridadora y se hornearon 3 minutos a 90 °C.

13.- Se colocaron las laminillas en hielo durante 3 minutos y después se pre-hibridaron dentro de la cámara húmeda durante 2 h a 42 °C.

### **Hibridación *in situ***

14.- Para cada tejido, se utilizaron 4 ng/μl de sonda, las diluciones se realizaron siempre con H<sub>2</sub>O DEPC, después de preparar las diluciones, la sonda se desnaturalizó a 65 °C durante 10 minutos e inmediatamente después se colocó en hielo, a continuación se colocaron 10 μl de sonda en el tejido.

15.- Se incubó a 42 °C por 16 h en la palangana húmeda.

### **Post-hibridación**

16.- Las laminillas se lavaron con trietanolamina durante 5 minutos y después con RNAsa (20 μg/50 ml de buffer de RNAsa)

17.- Las laminillas se colocaron en un vaso de Koplín con buffer SSC 2X durante 5 minutos a 42 °C y se incubaron 3 veces con formamida al 60%/SSC 0.2X a 37° C durante 5 minutos.

18.- Se incubaron 2 veces con SSC 2X y una vez con trietanolamina a temperatura ambiente, durante 5 minutos.

19.- En cada tejido se colocaron 10-20 μl de trietanolamina saturado con mezcla de bloqueo al 5% y se incubaron dentro de la cámara húmeda a temperatura ambiente durante 30 minutos.

20.- Se eliminó el exceso de solución sobre un papel absorbente, eliminando a su vez el líquido que se encuentra en los extremos de la laminilla.

21.- Se preparó una dilución 1:200 del anticuerpo policlonal antidigoxigenina en trietanolamina saturado con mezcla de bloqueo al 1% y se adicionó una cantidad que cubriera el tejido, incubando 2 horas a 37 °C.

22.- Los tejidos se lavaron dos veces con trietanolamina durante 5 minutos en agitación suave y una vez con PBS durante 10 minutos.

23.- Los tejidos se cubrieron con una solución de BCIP/NBT y levamisol en PBS y se incubaron de 2-16 h en obscuridad y a temperatura ambiente.

23.- Posteriormente se preparó un tren de deshidratación lavando los tejidos 2 veces con etanol al 70 %, una vez con etanol al 80, 90, 100% y 2 veces con xilol al 100%, se eliminó el exceso de xilol y se montaron las preparaciones.

#### **ANEXO IV.- Inmunohistoquímica.**

##### **Recuperación de Antígenos (epítopes).**

Una vez hidratados los cortes, se sometieron a temperatura de 121 °C y a 15 libras de presión, esto con el fin de exponer/desenmascarar los epítopes de las proteínas de pRB110 y de las proteínas E6/E7 del VPH.

Una vez que las laminillas pasaron por el proceso de recuperación de antígenos, éstas se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 20 minutos.

Se colocaron en vaso de coplin de plástico y se lavaron con agua destilada (2 veces).

Se incubaron por 5 minutos en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%.

Se lavaron con agua destilada (2 veces) y se lavaron posteriormente en PBS 1X.

Se incubaron por 5 minutos en Albúmina Bovina al 1%.

Se incubaron por 24 hrs con el anticuerpo monoclonal anti-RB y el anticuerpo policlonal anti-VPH respectivamente.

Transcurrido este tiempo se lavaron por 5 minutos con PBS 1X.

Se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado por 30 minutos.

Se lavaron por 5 minutos con PBS 1X.

Se incubaron con el complejo estreptavidina/peroxidasa por 30 minutos.

Se lavaron por 5 minutos con PBS 1X.

Se agregó el cromógeno y se monitoreó al microscopio hasta obtener la reacción deseada.

Se lavaron con agua destilada (2 veces) y se contratiñó con hematoxilina de Harris por 3 minutos.

Se lavaron con agua corriente por 3 minutos.

Se diferencia la hematoxilina con una solución de Hidróxido de Amonio al 0.37 M por 15 segundos.

Se lavaron con agua corriente por 30 segundos y posteriormente se deshidrataron en el tren de deshidratación /hidratación ya mencionado anteriormente, (solo hasta alcohol absoluto)

Se dejaron secar las laminillas y posteriormente se montaron con resina sintética (Entellan).

### **Inmunohistoquímica con sistema de amplificación de señal**

Con la finalidad de evitar obtener resultados falsos negativos por la eficiencia en el sistema de detección por inmunohistoquímica, se analizaron las muestras con un sistema de amplificación de señal de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Para la tinción de inmunohistoquímica (IHQ), las piezas quirúrgicas fueron fijadas en formaldehído al 10% amortiguado con fosfatos e incluidas en parafina. Se realizaron cortes a 2 $\mu$  para realizar la técnica de IHQ y se utilizó el complejo biotina- tiramida-estreptavidina/peroxidasa, usando el sistema de detección CSA (*Catalyzed Signal Amplification system peroxidase*, cat. K1500, y cat. K1498 Dako Corporation, Carpintería Calif. USA). Se utilizó Citrato de Sodio al 0.1 M, pH 6.2, 0.1% tween 20 para el desenmascaramiento de epítopes, para bloquear la actividad de peroxidasa endógena, las muestras fueron tratadas con peróxido de Hidrógeno al 0.3% en medio acuoso por 5 minutos. Para eliminar los sitios de unión inespecíficos del anticuerpo, la muestra fue tratada con Albúmina Sérica Bovina al 1% en PBS por 5 minutos, posteriormente la muestra se incubó por 45 minutos con los anticuerpos monoclonales anti RB (Clona Rb1 cat. M7131), p53 (clona DO-7, cat. M7001) y Ki-67 (Clona MIB-1, cat. M7240) todos de la marca Dako Corporation, Carpintería Calif. USA; otros anticuerpos utilizados fueron anti E2F-1 (Clona KH95, cat. cs-251, Sta. Cruz Biotech), anti C-fos (policlonal ADYE cat. PU-3480300), anti C-jun (Clona C-jun 88 cat. AM-3490501) y anti C-myc (Clona 9E10 cat. MU318-UC), estos últimos de la marca BIOGENEX San Ramón Calif. USA. Las muestras fueron incubadas con el anticuerpo anti-ratón/anti-conejo biotinilado, con el complejo estreptavidina/biotina por 20 minutos, con el complejo Tiramida/Biotina por 20 minutos y

con el complejo estreptavidina/peroxidasa por 30 minutos, para visualizar la reacción se utilizó como sustrato 3,3'-deaminobencidina-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Dako Corporation, Carpintería Calif. USA) y se monitoreo al microscopio, posteriormente se deshidrataron las muestras y se montaron con resina sintética.

**Los tejidos de control utilizados fueron:**

Papiloma Faríngeo positivo a VPH 11.

Tejido de Cérvix positivo a VPH 16.

Osteosarcoma positivo a RB.

El sistema de detección utilizado fue de peroxidasas (LSAB+)/DAB.

### **ANEXO V.- RT-PCR *in situ*.**

Se colocaron secciones de tejido de 3  $\mu$  sobre laminillas silanizadas y se incubaron toda la noche a 60 °C, se desparafinaron con xileno durante 5 y 10 minutos y lavados con gradientes de etanol al 100% por dos minutos, 95% un minuto, 70% un minuto y 50% un minuto. Después de concluida la desparafinación las laminillas fueron incubadas con buffer de lisis de proteínas (0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 50 nM EDTA, pH 8.0) conteniendo 0.5  $\mu$ g/ml proteinase K por 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente los tejidos fueron tratados con 1ul/muestra de DNAsa I libre de RNAsa por 48 h a temperatura ambiente, a continuación se lavaron los tejidos dos veces con agua tratada con DEPC, y la reacción de transcripción reversa se llevó a cabo utilizando el kit comercial Superscript II Reverse Transcriptase siguiendo las indicaciones del fabricante. A cada sección de tejido se le agregaron 70 $\mu$ l de una solución que contenía 2.5  $\mu$ g de oligo(dt), 10 mM dNTP mix (10 mM de cada dATP, dGTP, dCTP y dTTP a neutral pHneutro), 5X de buffer de síntesis para la primera cadena, 0.1 M DTT, 40 u/ $\mu$ l de inhibidor de ribonucleasa y 1  $\mu$ l de transcriptasa reversa por cada sección de tejido, las laminillas fueron incubadas a 55 °C por 1 h en una cámara húmeda sellada los primers utilizados se muestran en la Tabla 8. Como controles negativos se utilizaron reacciones con H<sub>2</sub>O en sustitución de primers o de transcriptasa reversa.

### **Detección de cDNA *in situ***

Para este proceso se utilizó un método de inmunotinción indirecta utilizando un anticuerpo primario de anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina. Para ello, los tejidos se incubaron con solución de bloqueo BSA al 5% en PBS por 30 minutos. A continuación se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente en presencia de 100  $\mu$ l de una solución

que contenía: anticuerpo anti-Digoxigenina diluido 1:200 en 100 mM Tris-HCl pH 7.4 y NaCl 150 mM, como control negativo se utilizó una reacción carente de anti-Digoxigenina, la detección de fosfatasa alcalina se llevó a cabo por incubación de 20 minutos en presencia de NBT/BCIP una vez que se obtenía la señal positiva al cambio de coloración, las laminillas se enjuagaron con agua destilada por 5 minutos para detener la reacción y se dejaron secar al aire para finalmente montarlas con medio histológico de permount y se analizaron al microscopio.

### **Síntesis de cDNA por RT-PCR *in Vitro***

Para este proceso se utilizaron de 10-20 mg de tumor incluidos en etanol al 70%, el tejido se lisó pasándolo de 5 a 10 veces por una jeringa con aguja de calibre 20-G. El RNA total se purificó utilizando el Kit comercial de RNeasy (QIAGEN) y el cDNA se sintetizó utilizando 5 u// $\mu$ l de AMV Transcriptasa Reversa y 5 u// $\mu$ l de DNA polimerasa *Tf I* siguiendo las indicaciones del fabricante (Access RT-PCR System, Promega) el transcrito de RNA del gen *RB1* se analizó utilizando tres juegos de primers que permiten analizar el transcrito en tres dominios y un par de primers más con la finalidad de poder sintetizar la secuencia completa en un sólo ensayo (CUADRO 13). Los primer utilizados se diseñaron de acuerdo con la estructura y secuencia genómica del gen *RB1* (Mcgee 1989) y la información contenida en la NCBI (L11910 Human retinoblastoma [gi.292420]). Los productos de la RT-PCR se analizaron mediante geles de azarosa al 2% con 100v por 20 minutos y empleando bromuro de etidio.

CUADRO 13.- Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para sintetizar el cDNA del gen *RB1*

Primer	Secuencia	Temperatura de alineamiento	Region de amplificación
J1-27RT1	3'-ATg CCg CCC AAA ACC CCC CgA AAA-5'		Transcrito total
J1-27RT2	5'-CTA Tgg AgT TTg TTC CTT CTC TTT-3'	55 °C $\pm$ 1 °C	
J1-3RT3	3'-gCC gCC ACC gCC gCC gCT gCC gCC-5'		
J1-3RT4	5'-gAC TCg ATg TCT TTT TgT ATC TTT-3'	55 °C $\pm$ 1 °C	Exon 1 to 3
J10-14RT7	3'-gTT gAA AAT CTT TCT AAA CgA TAC-5'		
J10-14RT8	5'-CAT TAC CTT Agg TAC gAA TTT AgT-3'	55 °C $\pm$ 1 °C	Exon 10-14
J22-27RT5	3'-ACA TTC AAA CgT gTT TTg ATC AA-5'		
J22-27RT6	5'-gTT TTC gTC TTT TAC TTA CTA TC-3'	55 °C $\pm$ 1 °C	Exon 22 a 27



### Control de Integridad del RNA

Se verificó la integridad de cada muestra buscando la presencia de las subunidades de RNA ribosomal de origen humano en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Como control interno de reacción y de calidad, se sintetizó el cDNA del gen de la  $\beta$ -globina de cada una de las muestras analizadas Figuras 24 y 25.

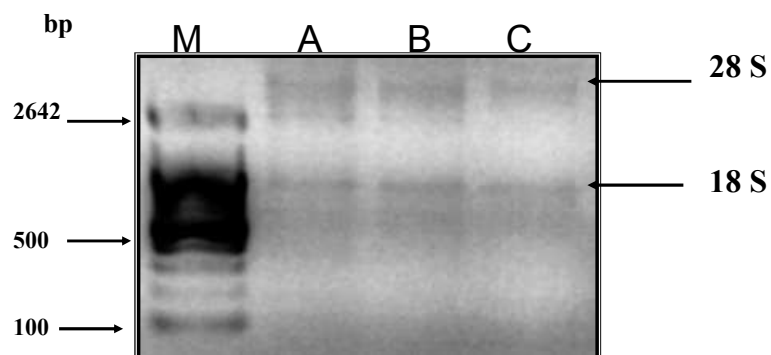


Figura 24.- **Integridad de RNA en geles de agarosa.** En humanos las sub-unidades ribosomales 28 S y 18 S tienen un tamaño de 5.0 y 1.9 kpbs respectivamente (Griffiths 2000; Darnell 2000), en la imagen A, B y C corresponden a tres muestras diferentes, M: estándar de peso Molecular.



1            2            3            4            M

Figura 25.- **Síntesis de cDNA de  $\beta$ -Globina.** En todas las muestras se sintetizó el cDNA del gen de la  $\beta$ -Globina como control de calidad y como control interno de reacción debido a su tamaño pequeño. Las bandas 1 a 4 corresponden a muestras diferentes, M corresponde al estándar de peso Molecular.

**ANEXO VI .- Datos clínicos importantes de los pacientes.**

PACIENTE	BIOPSIA	EXPEDIENTE	TUMOR	AHF	SIGNOS	GENERO	EDAD DE INICIO EN MESES
RB-1	B00-113	404489	UNILATERAL IZQUIERDO	NEGADOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	1
RB-2	B00-143	402523	UNILATERAL IZQUIERDO	NEGADOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	5
RB-3	B00-1571	407751	UNILATERAL IZQUIERDO	POSITIVOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	24
RB-4	B00-217	404662	UNILATERAL IZQUIERDO	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	6
RB-5	B00-2553	409628	UNILATERAL IZQUIERDO	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	36
RB-6	B01-1347	411869	BILATERAL	NEGADOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	0.5
RB-7	B01-1411	413449	UNILATERAL DERECHO	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	36
RB-8	B01-1558	414109	UNILATERAL IZQUIERDO	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	50
RB-9	B01-1988	415133	UNILATERAL DERECHO	NEGADOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	3
RB-10	B01-2779	416878	UNILATERAL IZQUIERDO	NEGADOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	34
RB-11	B89-2389	320750	UNILATERAL IZQUIERDO	NEGADOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	28
RB-12	B90-541	323423	UNILATERAL IZQUIERDO	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	2
RB-13	B90-545	324079	UNILATERAL DERECHO	NEGADOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	48
RB-14	B91-1298	336305	UNILATERAL DERECHO	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	5
RB-15	B92-1626	346898	UNILATERAL DERECHO	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	5
RB-16	B92-926	331813	UNILATERAL IZQUIERDO	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	2
RB-17	B93-1494	354941	BILATERAL	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	3
RB-18	B93-917	353523	UNILATERAL DERECHO	NEGADOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	2
RB-19	B95-752	368944	BILATERAL	NEGADOS	ESTRABISMO	MASCULINO	4
RB-20	B97-2556	389170	UNILATERAL DERECHO	NEGADOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	3
RB-21	B98-2957	395943	UNILATERAL DERECHO	NEGADOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	52
RB-22	B98-445	390594	BILATERAL	NEGADOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	21
RB-23	B99-1192	397660	UNILATERAL DERECHO	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	4
RB-24	B99-1311	399750	UNILATERAL DERECHO	NEGADOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	36
RB-25	B99-1316	399796	UNILATERAL DERECHO	NEGADOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	12
RB-26	B99-1521	400378	BILATERAL	POSITIVOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	6
RB-27	B99-2876	402998	UNILATERAL DERECHO	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	12
RB-28	B00-382	392061	BILATERAL	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	12
RB-29	B00-943	387912	UNILATERAL IZQUIERDO	NEGADOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	24
RB-30	B91-1115	327477	BILATERAL	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	6
RB-31	B91-1898	338169	BILATERAL	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	5
RB-32	B91-2514	339891	BILATERAL	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	4
RB-33	B92-1083	345134	BILATERAL	POSITIVOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	2
RB-34	B92-1172	340620	BILATERAL	NEGADOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	21
RB-35	B92-1945	347685	UNILATERAL DERECHO	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	18
RB-36	B92-2397	348951	BILATERAL	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	1
RB-37	B92-643	343970	BILATERAL	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	1
RB-38	B93-1236	333879	BILATERAL	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	6
RB-39	B93-2425	357869	BILATERAL	NEGADOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	5
RB-40	B94-1129	362533	BILATERAL	NEGADOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	7
RB-41	B94-1282	362970	BILATERAL	NEGADOS	ESTRABISMO	MASCULINO	8
RB-42	B94-2146	365453	BILATERAL	NEGADOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	5

AHF: Antecedentes Heredo Familiares. **Pacientes analizados para la búsqueda de mutaciones (48).**

**ANEXO VI .- Datos clínicos importantes de los pacientes (Continuación).**

PACIENTE	BIOPSIA	EXPEDIENTE	TUMOR	AHF	SIGNOS	GENERO	EDAD DE INICIO EN MESES
RB-49	B02-26	414492	UNILATERAL IZQUIERDO	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	24
RB-50	B02-48	417339	UNILATERAL IZQUIERDO	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	24
RB-51	B02-94	417645	BILATERAL	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	6
RB-52	B02-234	417819	UNILATERAL IZQUIERDO	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	36
RB-53	B02-274	416913	UNILATERAL IZQUIERDO	NEGADOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	24
RB-54	B02-433	418463	UNILATERAL DERECHO	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	27
RB-55	B02-515	417953	BILATERAL	NEGADOS	ESTRABISMO	FEMENINO	2
RB-56	B02-554	408505	UNILATERAL DERECHO	NEGADOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	16
RB-57	B02-556	418747	BILATERAL	NEGADOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	2
RB-58	B02-591	419086	UNILATERAL DERECHO	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	16
RB-59	B02-602	404148	UNILATERAL IZQUIERDO	NEGADOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	12
RB-60	B02-633	418700	UNILATERAL IZQUIERDO	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	36
RB-61	B02-638	414027	BILATERAL	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	1
RB-62	B02-643	415499	BILATERAL	NEGADOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	1
RB-63	B02-676	419151	UNILATERAL IZQUIERDO	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	15
RB-64	B02-783	414574	BILATERAL	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	1
RB-65	B02-874	416075	UNILATERAL IZQUIERDO	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	12
RB-66	B02-890	419297	UNILATERAL IZQUIERDO	NEGADOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	24
RB-67	B02-971	419933	UNILATERAL IZQUIERDO	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	36
RB-68	B02-1035	418748	BILATERAL	NEGADOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	7
RB-69	B02-1037	418447	UNILATERAL IZQUIERDO	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	23
RB-70	B02-1158	420718	UNILATERAL IZQUIERDO	NEGADOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	26
RB-71	B02-1204	420834	UNILATERAL IZQUIERDO	NEGADOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	12
RB-72	B02-1243	404148	BILATERAL	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	3
RB-73	B02-1250	419854	BILATERAL	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	4
RB-74	B02-1280	420927	UNILATERAL DERECHO	NEGADOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	12
RB-75	B02-1304	420998	UNILATERAL DERECHO	NEGADOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	14
RB-76	B02-1446	421361	UNILATERAL DERECHO	NEGADOS	ESTRABISMO	FEMENINO	6
RB-77	B02-1473	418700	BILATERAL	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	4
RB-78	B02-1542	419964	UNILATERAL DERECHO	NEGADOS	LEUCOCORIA	FEMENINO	5
RB-79	B02-1580	421170	BILATERAL	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	3
RB-80	B02-1731	421084	UNILATERAL DERECHO	NEGADOS	LEUCOCORIA	MASCULINO	7

***M en BE Miguel Macías Vega***

AHF: Antecedentes Heredo Familiares. **Pacientes agregados al estudio para analizar la expresión del gen RB1 (32).**

# Spectrum of *RB1* gene mutations and loss of heterozygosity in Mexican patients with retinoblastoma: Identification of six novel mutations

M. Macías<sup>a,b,1</sup>, M. Dean<sup>c</sup>, A. Atkinson<sup>c</sup>, S. Jiménez-Morales<sup>d</sup>, F.J. García-Vazquez<sup>e</sup>,  
Y. Saldaña-Alvarez<sup>d</sup>, J. Ramírez-Bello<sup>d</sup>, M. Chávez<sup>a</sup> and L. Orozco<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup>Clinical Research Laboratory, National Institute of Paediatrics, Mexico City, Mexico

<sup>b</sup>PhD Program in Biomedical Sciences, UNAM, Mexico City, Mexico

<sup>c</sup>National Cancer Institute, NIH Frederick, MD, USA

<sup>d</sup>Laboratory of Genomic of Complex Diseases, National Institute of Genomics Medicine, Mexico City, Mexico

<sup>e</sup>Pathology Department, National Institute of Pediatrics, Mexico City, Mexico

**Abstract.** *RB1* mutation detection has greatly improved the clinical management of retinoblastoma and provides critical information to predict the risk of inheriting the disease. We screened for *RB1* gene sequence alterations in both peripheral blood and tumor specimens from a total of 48 Mexican retinoblastoma patients using an SSCP-based screening approach followed by sequencing. Overall, 21 (43.8%) cases were bilateral and 27 (56.2%) were unilateral. Interestingly, 51.8% of unilateral patients developed the tumor before age 1 year and 10 of which (71.4%) were diagnosed before the age of 6 months. Thirteen different oncogenic mutations were detected in 14/48 (29.2%) patients, 9 of which were germline (64.3%). Six of these mutations are novel (IVS3-1G>T, 125X, 389X, 610X, 750X and -149G>T). The most frequent types of mutation were frameshift and nonsense (30.8% each). Moreover, 5 intronic variants were identified, two of which are novel (g.41908 C/A and g.161976del6T). Loss of heterozygosity of the *RB1* gene as assessed by intron1/*Bam*HI and intron17/*Xba*I intragenic markers was 50.0% (18 of 36 informative cases), being higher in tumors with known mutations (76.9% vs 34.8%). This low mutation detection rate and the earlier age at diagnosis in unilateral retinoblastoma cases suggest that other *RB1* inactivating mechanisms could be present in the retinoblastoma development.

In this study, mutation analysis was not helpful to distinguish sporadic and hereditary retinoblastoma, so, other approaches are needed to improve the molecular diagnosis of retinoblastoma and supports further investigations of Mexican retinoblastoma patients.

**Keywords:** Retinoblastoma, *RB1* gene, mutations, loss of heterozygosity, Mexican patients

## 1. Introduction

Retinoblastoma (MIM# 180200) arises predominantly during the first 5 years of life. While it is estimated to occur in one of every 15,000–20,000 live births worldwide, the incidence of retinoblastoma is apparently higher in developing countries [40,51,52]. A recent multicenter clinical study revealed that retinoblastoma

\*Corresponding author: Dr. L. Orozco, Investigación, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Periférico Sur 4124, Torre Zafiro II, 6 piso, Col. Jardines del Pedregal, Mexico City, Mexico, CP 01900. E-mail: lorozco@inmegen.gob.mx; lorozco.oroazco@yahoo.com.mx.

<sup>1</sup>This work was submitted in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree at Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

is currently the second most common solid malignancy in pediatric patients in Mexico [28].

A mutational meta-analysis identified more than 900 distinct mutations that inactivate the *RB1* gene [54], which are predominately nonsense, frameshift and splicing mutations [46,49]. Tumor development requires the inactivation of both *RB1* alleles [26] and loss of heterozygosity (LOH) of the 13q14 locus is the most common mechanism by which the wild type *RB1* allele is lost in a retinal cell. In non-hereditary cases, both mutational events are believed to occur during the somatic development of retinal cells resulting in a unilateral tumor of relatively late onset (> 1 year) [25]. The hereditary form is associated with the presence of *RB1* germline mutations and is transmitted as an autosomal dominant trait with high penetrance (90%). Overall, hereditary retinoblastoma accounts for 40% of all cases and is generally bilateral with an early onset (< 12 months) [26]. However, pedigree studies have shown that 10 to 15% of hereditary retinoblastoma is unilateral and clinically undistinguishable from true non-hereditary retinoblastoma, with a 45% recurrence risk for the offspring. Many studies give evidences that the identification of the spectrum of somatic or germline mutations in affected patients and the detection of at-risk relatives provides critical information for accurate genetic counseling in retinoblastoma families, improving the quality of clinical management [6,11,18,23,27,42,47]. To determine the frequency and nature of *RB1* mutations in Mexican patients, we performed an extensive *RB1* gene analysis of 48 unrelated families with retinoblastoma.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Patients

Forty-eight patients with clinical and histopathological diagnosis of retinoblastoma attending the National Institute of Pediatrics (Mexico City, Mexico) and their first-degree relatives were included in the study. Informed consent was obtained from all individuals and all informative families received accurate genetic counseling.

### 2.2. Mutation screening analysis

Genomic DNA samples were extracted from leukocytes of all index cases and their parents, using the standard phenol/chloroform method [45]. DNA from paraf-

fin embedded tissue was obtained from all probands by the proteinase K digestion procedure (QIAGEN GmbH, Hiden, Germany). Blood and tumor DNA samples were screened for *RB1* mutations in all 27 exons, splice junctions and the promoter region by single strand conformation polymorphism analysis (SSCP) as previously described [3]. The PCR mixture contained 40 ng of genomic DNA, 2.5 pmoles of each primer, dNTPs in addition of ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)-dCTP, 0.5 U of Taq polymerase and the reaction buffer provided by the supplier (Applied Biosystems). DNA fragments displaying abnormal electrophoretic patterns were sequenced directly with a DNA Sequencing Kit with Big Dye Terminator on an automated ABI PRISM 3100 DNA sequencer (Applied Biosystems). All parents of the patients with mutations in blood were tested for these mutations. Mutations are reported according to the update on nomenclature for human gene mutations by den Dunnen and Antonarakis [17].

### 2.3. Loss of heterozygosity (LOH) analysis

Tumor samples were analyzed for LOH using 2 intragenic restriction fragment length polymorphisms, *Bam*HI in intron 1 and *Xba*I in intron 17. *RB1* introns 1 and 17 were amplified by PCR according to Bookstein and McGee [4,33]. DNA fragments were resolved by electrophoresis through 2% agarose gels.

## 3. Results

We studied a total of 48 unrelated Mexican patients with retinoblastoma, 21 (43.8%) with bilateral and 27 (56.2%) with unilateral tumors. Only three bilateral and none unilateral cases had a family history of retinoblastoma. Mean age of onset was 5 months among bilateral retinoblastoma cases, and interestingly, more than half of unilateral patients 14/27 (51.8%) developed the tumor before age 1 year, 10 of which (71.4%) were diagnosed before the age of 6 months.

### 3.1. Mutation screening

*RB1* gene analysis detected 13 different mutations in 14/48 retinoblastoma patients (29.2%), 9 of which were germline (64.3%). These constitutional mutations found in both blood and tumoral tissue, were observed only in bilateral retinoblastoma cases (9/21, 42.8%). The 5-remainder mutations were somatic, 4 were identified in unilateral cases (4/27, 14.8%), and

Table 1  
Mutations detected in retinoblastoma patients

Patient	Sex/onset (m)	Laterality	Location	Description	Putative consequence	Identified in	LOH	Reference
RB-19	M/4	B	Promoter Intron 3	g.1911G >T -149G >T g. 41925 G>T	Sp1 site Splicing	Blood Tumor Tumor	-	NOVEL NOVEL
RB-33	F/2	B	Exon 3	g.39478 G>A	W99X	Blood Tumor	+	Blanquet et al. [3]
RB-34	F/21	B	Exon 3	g.39518insGA	(M113fs) 125X	Blood Tumor	+	NOVEL
RB-47	M/5	U	Exon 8	g.59683C>T	R251X	Tumor	+	Cowell et al. [12]
RB-22	F/21	B	Exon 11	g.65386C>T	R358X	Blood Tumor	+	Yandell et al. [55]
RB-2	F/5	U	Exon 11	g.65386C>T	R358X	Tumor	+	Yandell et al. [55]
RB-46	F/4	U	Exon 11	g.65386C>T	R358X	Tumor	+	Yandell et al. [55]
RB-6	F/0.5	B	Exon 12	g.70274delT	(M387fs) 389X	Blood Tumor	+	NOVEL
RB-44	F/8	B	Exon 17	g.78169insT	R554X	Blood Tumor	+	Lohmann et al. [30]
RB-37	M/1	B	Exon 18	g.150038delG	(R579fs) 610X	Blood Tumor	+	NOVEL
RB-35	M/18	U	Exon 21	g.160796insT	(V725fs) 750X	Tumor	-	NOVEL
RB-26	F/6	B	Exon 22	g.162049delTCT	ΔF750*	Blood Tumor	+	Lohmann et al. [31]
RB-29	F/24	U	Intron 24	g.170403+1G>A	Splicing	Tumor	-	Ritcher et al. [43]
RB-17	M/3	B	Intron 24	g.170405+3 delGAGT	Splicing	Blood Tumor	NI	Hogg et al. [21]

M: male; F: female; m: months; U: unilateral; B: bilateral; +: LOH, -: without LOH, NI: No Informative, \*Mutation found in the patient and her mother.

one was identified in a bilateral retinoblastoma patient who simultaneously carried a different germline mutation (Table 1). Mutations were not identified in none of bilateral cases with family history.

Regarding the nature and location of the 13 mutations, one (7.7%) new mutation occurred in the promoter region at 1911 position (-149G>T), nine (69.2%) occurred in exonic regions, and three (23.1%) were splice site mutations. Of the exonic mutations, four (30.8%) were previously reported nonsense mutations (W99X, R251X, R554X and R358X which was found in 3 unrelated patients) [3,12,30,55]; four (30.8%) were novel frameshift mutations (125X, 389X, 610X, 750X) and one (7.7%) was a previously described 3-bp deletion (ΔF750) [31]. Two of the splice site mutations had been previously reported (IVS24 +1G>A, IVS24+3delGAGT) [21,43], and the remainder is novel (IVS3-1G>T). Both -149G>T and IVS3-1G>T were found in tumoral tissue of a patient, the first one was also present in peripheral blood cells. All germline mutations identified in *proposita* were sought in their parents. Nevertheless, only one case of non-penetrance was evident in an unaffected mother carrying the ΔF750 mutation, who inherited the constitutional mutation to her affected son (Table 1). In addition, five variants were found on intronic sequences (Table 2). They included two transversions in introns 3 and 4 (41908C/A, 42068G/T) [48]; two transitions in introns 19 and 25 (156616A/G and 174351T/A, respectively) [35,55], and a 6-bp deletion (T<sub>18</sub>-T<sub>24</sub>) (161976del6T) in a thymidine tract located at position 161958-161981 in intron 21 (-39 to -16 of the splice site). All these

variations were also found in one of the unaffected parents. Overall, 8/19 (44%) of all variations and mutations (IVS3-1G>T, M113fsX125, M387fsX389, R579fsX610, V725fsX750 and -149G>T, 41908C/A and 161976del6T) have not been previously described in the *RB1* gene mutation database [<http://rb1-ldb.d-lohmann.de/>] [32].

### 3.2. LOH

To identify allele loss in tumor tissue we analyzed two intragenic RFLPs (intron1/*Bam*HI and intron17/*Xba*I). Peripheral blood DNA samples were heterozygous for at least one of the RFLPs in 36 (75%) of retinoblastoma index cases (Table 3), 39.5% (19/48) were heterozygous for *Bam*HI and 64.6% (31/48) were informative for *Xba*I. LOH in tumor samples was observed in 50% of informative cases: 7 occurred in patients carrying germline mutations, 3 in unilateral cases with somatic mutations, and 8 in cases with no identified mutations. Analysis of parental origin of *RB1* alleles showed preferential loss of paternal alleles (80%).

## 4. Discussion

Although it is generally agreed that mean age of onset is > 1 year in non-hereditary retinoblastoma and < 1 year in hereditary retinoblastoma [2], it seems that this epidemiological pattern differed in the present group of Mexican retinoblastoma patients. The age of onset was < age 1 year in 14/27 (51.9%) and < 6 months in 10/27 (37%) unilateral cases, very similar to the

Table 2  
RB1 polymorphisms in Mexican patients

Intron	Change	Allele 1	Allele 2	Reference
3	g. 41908 C/A	C	A	NOVEL
4	g. 42068 G/T	G	T	Sivakumaran et al. [48]
19	g. 156616 A/G	A	G	Mateu et al. [35]
21	g. 161976 del 6T	T <sub>24</sub>	T <sub>18</sub>	NOVEL
25	g. 174351 T/A	T	A	Yandell et al. [55]

Table 3  
Loss of heterozygosity in retinoblastoma patients

Polymorphism	Informative cases (IC) <i>n</i> = 36 (%)	LOH in IC with mutations <i>n</i> = 13 (%)	LOH in IC without mutations <i>n</i> = 23 (%)	TOTAL LOH <i>n</i> = 36 (%)
BamHI	19 (39.5)	8 (61.5)	5 (21.7)	13 (36)
XbaI	31 (64.6)	9 (69.2)	7 (30.4)	16 (44)
BamHI and XbaI	36 (75)	10 (76.9)	8 (34.8)	18 (50)

age of onset generally reported for bilateral retinoblastoma. Lower age at diagnosis in unilateral cases is not unique to the Mexican population, as previously reported in other Hispanic populations such as Argentina (12.5 months), Spain, Colombia, Cuba (12.23 months) and others [2,14,34,44]. Moreover, a study including 188 unilateral retinoblastoma patients revealed that age at diagnosis was not different between patients with and without constitutional mutations [50]. Because age of onset is not helpful to establish a differential diagnosis between hereditary and non-hereditary unilateral retinoblastoma, and because molecular screening has been shown to improve the clinical management and genetic counseling in affected families [23,27,42,43], we used SSCP analysis and sequencing to screen all 27 exons, splice junctions, and the promoter region of the *RB1* gene in 48 Mexican families. However, because the mutation detection rate was low among the unilateral retinoblastoma cases (4/27, 14.8%), mutation analysis was not helpful to distinguish sporadic and hereditary retinoblastoma in this group.

We identified 13 different oncogenic variations in 14 patients. The pattern and the nature of mutations were very similar to those reported in other populations [3, 24,46], the main type of mutations was frameshift or nonsense and six (46%) were novel (Table 1) (mutations not previously described in the *RB1* gene mutation database) [32]. A case of non-penetrance was documented in an unaffected mother who carried the 3-bp inframe deletion ( $\Delta F750$ ) identified in peripheral blood and tumoral DNA of her bilaterally affected son. Because missense and inframe insertions/deletions generally result in a mutant RB protein retaining partial activity (weak allele), the possible residual function of the  $\Delta F750$  RB protein may have avoided tumorigenesis in

the mother [1,13,39]. However, maternal mosaicism for the  $\Delta F750$  deletion was not ruled out and may be the cause of non-penetrance. Otherwise, Kudson's first and second hits as two independent events, were documented in a patient with both a constitutional mutation and a somatic mutation.

In addition, five intronic sequence changes were observed (Table 2): three previously described [35,48,55] and two novel (41908C/A and 161976del6T). A 6-bp deletion of the intron 21 T<sub>18-24</sub> polythymidine tract was found in a patient and his unaffected mother in whom no other *RB1* sequence variations were identified. This deletion is particularly interesting, as other intronic polynucleotide tract deletions have been reported to affect gene expression. A well-studied example is the polythymidine deletion occurring at the intron 8-splice acceptor site (IVS8-T) of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene, with 3 distinct alleles (5T, 7T and 9T). The 5T allele is known to transcribe a lower amount of normal CFTR mRNA transcripts and is associated with atypical CF and congenital bilateral absence of vas deferens (CBAVD) [10]. The role of polythymidine tracts in constitutive exon skipping is not well understood, but there is evidence of their possible role in disease severity and penetrance. Functional assays for the 161976del6T variant have not been performed, so a possible oncogenic role of this 6-bp deletion cannot be ruled out.

Although the entire coding and promoter regions of the *RB1* gene were analyzed, the mutation detection rate was low (29.2%). SSCP has been used frequently for mutation screening of *RB1* mutations [5,15,31,44, 46,49,56]. Although overall SSCP sensitivity is 80–90% [40], *RB1* mutation detection rate in retinoblastoma patients by SSCP varies widely [49–56]. Low



RB1 mutation detection rates by SSCP and other techniques such as PCR-heteroduplex have been previously reported in patients from Argentina (29%), Brazil (36%), Mexico (26%), Ecuador (30%), Spain and other countries [2,5,14,29,44]. While other more efficient techniques as quantitative multiple PCR (QM-PCR) and high performance liquid chromatography (HPLC) should be used to identify all mutations, the heterogeneity of RB1 inactivating mutations suggests that no single technology will be fully sensitive and efficient [22, 43,53], as gross rearrangements outside the analyzed regions, altered DNA methylation, or mutations in non-coding regions may be involved [46].

On the other hand, LOH is the most frequent type of second hit in retinoblastoma, occurring in about 60% of cases [7,9,20,57,58]. Constitutional heterozygosity for at least one of the polymorphic loci was observed in 75% of the patients, and LOH was observed in 50% (18/36) of informative cases. Although the frequency of LOH may be underestimated because these RFLPs do not span the entire RB1 gene, the low LOH and the low mutation detection rates, as well as the earlier age at diagnosis observed in our unilateral retinoblastoma cases, suggest that other oncogenic mechanisms play a significant role in the genesis of retinoblastoma. These mechanisms may include difference in dosage for one or more exons, methylation, increased phosphorylation of the pRB1 protein, caspase dependent degradation, mutations in other gene products interacting with pRB, aberrations outside the RB locus or RB sequestration by viral oncoproteins such as E1A and E7 [8,16,36–38, 40,41].

In this regard, although Orjuela et al. reported the presence of Human Papilloma Virus (HPV) sequences in tumor samples from retinoblastoma patients recruited from the same Institution (National Institute of Pediatrics) [40], we failed to find HPV sequences using a stepwise screening (data not shown). This is in accordance with the findings of Gillison et al. [19], who showed substantial evidence that HPV is not involved in the genesis of retinoblastoma. The results presented here, suggest that other approaches are needed to improve the molecular diagnosis of retinoblastoma in our patients, and that other factors involved in the genesis of retinoblastoma deserve further studies.

#### Acknowledgements

The authors wish to thank CONACYT (30714-M) for the financial support provided. Miguel Macías is grateful to CONACYT (Reg. No. 95354) and with DGEP-UNAM for the scholarship support.

#### References

- [1] P. Albrecht, B. Ansperger-Rescher, A. Schüler, M. Zeschmigg, B. Gallie and D.R. Lohmann, Spectrum of gross deletions and insertions in the RB1 gene in patients with retinoblastoma and association with phenotypic expression, *Hum Mutat* 26 (2005), 437–445.
- [2] J. Alonso, H. Frayle, I. Menéndez, A. López, P. García-Miguel, J. Abelairas, E. Sarret, M.T. Vendrell, A. Navajas, M. Artigas, J.M. Indiano, A. Carbone, C. Torrenteras, I. Palacios and A. Pestaña, Identification of 26 new constitutional RB1 gene mutations in Spanish, Colombian, and Cuban retinoblastoma patients, *Hum Mutat* 25 (2005), 99.
- [3] V. Blanquet, C. Turleau, M.S. Gross-Morand, C. Sénamaud-Beaufort, F. Doz and C. Besmond, Spectrum of germline mutations in the RB1 gene: a study of 232 patients with hereditary and non hereditary retinoblastoma, *Hum Mol Genet* 4 (1995), 383–388.
- [4] R. Bookstein, E.Y. Lee, H. To, L.J. Young, T.W. Sery, R.C. Hayes, T. Friedmann and W.H. Lee, Human retinoblastoma susceptibility gene: Genomic organization and analysis of heterozygous intragenic deletion mutants, *Proc Natl Acad Sci USA* 85 (1988), 2210–2214.
- [5] E. Braggio, C.R. Bonvicino, F.R. Vargas, S. Ferman, A.L. Eisenberg and H.N. Seuánez, Identification of three novel RB1 mutations in Brazilian patients with retinoblastoma by “exon by exon” PCR mediated SSCP analysis, *J Clin Pathol* 57 (2004), 585–590.
- [6] B. Brichard, M. Heusterspreute, P. De Potter, C. Chantrain, C. Vermynen, C. Sibille and J.L. Gala, Unilateral retinoblastoma, lack of familial history and older age does not exclude germline RB1 gene mutation, *Eur J Cancer* 42 (2006), 65–72.
- [7] W.K. Cavenee, T.P. Dryja, R.A. Phillips, W.F. Benedict, R. Godbout, B.L. Gallie, A.L. Murphree, L.C. Strong and R.L. White, Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma, *Nature* 305 (1983), 779–784.
- [8] B.N. Chau and J.Y. Wang, Coordinated regulation of life and death by RB, *Nat Rev Cancer* 3 (2003), 130–138.
- [9] K.W. Choy, C.P. Pang, C.B. Yu, H.L. Wong, J.S. Ng, D.S. Fan, K.W. Lo, J.T. Chai, J. Wang, W. Fu and D.S. Lam, Loss of heterozygosity and mutations are the major mechanisms of RB1 gene inactivation in Chinese with sporadic retinoblastoma, *Hum Mutat* 20 (2002), 408–416.
- [10] C.S. Chu, B.C. Trapnell, S. Curristin, G.R. Cutting and R.G. Crystal, Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA, *Nat Genet* 3 (1993), 151–156.
- [11] J.K. Cowell and B.L. Gallie, Which retinoblastoma patients should be screened for RB1 mutations? *Eur J Cancer* 34 (1998), 1825–1826.
- [12] J.K. Cowell, T. Smith and B. Bia, 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 (1994), 281–290.
- [13] J.K. Cowell and B. Bia, A novel missense mutation in patients from a retinoblastoma pedigree showing only mild expression of the tumor phenotype, *Oncogene* 16 (1998), 3211–3213.
- [14] V. Dalamón, E. Surace, F. Giliberto, V. Ferreiro, C. Fernandez and I. Szijan, Detection of germline mutations in argentine retinoblastoma patients: low and full penetrance retinoblastoma caused by the same germline truncating mutation, *J Biochem Mol Biol* 37 (2004), 246–253.
- [15] A.F. de Andrade, R. da Hora Barbosa, F.R. Vargas, S. Ferman, A.L. Eisenberg, L. Fernandes and C.R. Bonvicino, A

- molecular study of first and second RB1 mutational hits in retinoblastoma patients, *Cancer Genet Cytogenet* **167** (2006), 43–46.
- [16] C. Dehainault, D. Michaux, S. Pagès-Berhouet, V. Caux-Moncoutier, F. Doz, L. Desjardins, J. Couturier, P. Parent, D. Stoppa-Lyonnet, M. Gauthier-Villars and C. Houdayer, A deep intronic mutation in the RB1 gene leads to intronic sequence exonisation, *Eur J Hum Genet* **15** (2007), 473–477.
- [17] J.T. den Dunnen and S.E. Antonarakis, Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion, *Hum Mutat* **15** (2000), 7–12. <http://www.retina-international.com/sci-news/mutnom.htm>.
- [18] B.L. Gallie, Predictive testing for retinoblastoma comes of age, *Am J Hum Genet* **61** (1997), 279–281.
- [19] M.L. Gillinson, R. Chen, E. Goshu, D. Rushlow, N. Chen, C. Banister, K.E. Creek and B.L. Gallie, Human retinoblastoma is not caused by know pRb-inactivating human DNA tumor viruses, *Int J Cancer* **120** (2007), 1482–1490.
- [20] S.A. Hagstrom and T.P. Dryja, Mitotic recombination map of 13cen-13q14 derived from an investigation of loss of heterozygosity in retinoblastomas, *Proc Natl Acad Sci USA* **96** (1999), 2952–2957.
- [21] A. Hogg, B. Bia, Z. Onadim and J.K. Cowell, Molecular mechanisms of oncogenic mutations in tumors from patients with bilateral and unilateral retinoblastoma, *Proc Natl Acad Sci USA* **90** (1993), 7351–7355.
- [22] C. Houdayer, M. Gauthier-Villars, A. Laugé, S. Pagès-Berhouet, C. Dehainault, V. Caux-Moncoutier, P. Karczynski, M. Tosi, F. Doz, L. Desjardins, J. Couturier and D. Stoppa-Lyonnet, Comprehensive screening for constitutional RB1 mutations by DHPLC and QMPSF, *Hum Mutat* **23** (2004), 193–202.
- [23] B. Joseph, M.P. Shanmugam, M.K. Srinivasan and G. Kumaramanickavel, Retinoblastoma: genetic testing versus conventional clinical screening in India, *Mol Diagn* **8** (2004), 237–243.
- [24] V.S. Kiran, C. Kannabiran, K. Chakravarthi, G.K. Vemuganti and S.G. Honavar, Mutational screening of the RB1 gene in Indian patients with retinoblastoma reveals eight novel and several recurrent mutations, *Hum Mutat* **22** (2003), 339.
- [25] A.G. Knudson, Hereditary cancer: two hits revisited, *J Cancer Res Clin Oncol* **122** (1996), 135–140.
- [26] A.G. Knudson, Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma, *Proc Natl Acad Sci USA* **68** (1971), 820–823.
- [27] G. Kumaramanickavel, B. Joseph, K. Narayana, S. Natesh, G. Mamatha, M.P. Shanmugam, A. Elamparathi and J. Biswas, Molecular-genetic analysis of two cases with retinoblastoma: benefits for disease management, *J Genet* **82** (2003), 39–44.
- [28] C. Leal-Leal, M. Flores-Rojo, A. Medina-Sansón, F. Cerecedo-Díaz, S. Sánchez-Félix, O. González-Ramella, F. Pérez-Pérez, R. Gómez-Martínez, A. Quero-Hernández, E. Altamirano-Alvarez, F. Alejo-González, J. Figueroa-Carbajal, A. Ellis-Irigoyen, I. Tejolote-Romero, R. Cervantes-Paz, F. Pantoja-Guillén, L. Vega-Vega and F. Carrete-Ramírez, A multicentre report from the Mexican Retinoblastoma Group, *Br J Ophthalmol* **88** (2004), 1074–1077.
- [29] P.E. Leone, M.E. Vega, P. Jervis, A. Pestaña, J. Alonso and C. Paz-y-Miño, Two new mutations and three novel polymorphisms in the RB1 gene in Ecuadorian patients, *J Hum Genet* **48** (2003), 639–641.
- [30] D.R. Lohmann, M. Gerick, B. Brandt, U. Oelschläger, B. Lorenz, E. Passarge and B. Horsthemke, Constitutional RB1-gene mutations in patients with isolated unilateral retinoblastoma, *Am J Hum Genet* **61** (1997), 282–294.
- [31] D.R. Lohmann, B. Brandt, W. Höpping, E. Passarge and B. Horsthemke, Spectrum of small length germline mutations in the RB1 gene, *Hum Mol Genet* **3** (1994), 2187–2193.
- [32] D.R. Lohmann. RB1 gene mutations database, 2005. <http://rb1-lsdb.d-lohmann.de/>.
- [33] T.L. McGee, G.S. Cowley, D.W. Yandell and T.P. Dryja, Detection of the XbaI RFLP within the retinoblastoma locus by PCR, *Nucleic Acids Res* **18** (1990), 207.
- [34] D. Mastrangelo, S. De Francesco, A. Di Leonardo, L. Lentini and T. Hadjistilianou, Retinoblastoma epidemiology: does the evidence matter? *Eur J Cancer* **43** (2007), 1596–1603.
- [35] E. Mateu, F. Sánchez, C. Nájera, M. Beneyto, V. Castell, M. Hernández, I. Serra and F. Prieto, Genetics of retinoblastoma: a study, *Cancer Genet Cytogenet* **95** (1997), 40–50.
- [36] A. Mairal, E. Pinglier, E. Gilbert, M. Peter, P. Validire, L. Desjardins, F. Doz, A. Aurias and J. Couturier, Detection of chromosome imbalances in retinoblastoma by parallel karyotype and CGH analyses, *Genes Chromosomes and Cancer* **28** (2000), 370–379.
- [37] K.E. Nichols, M.D. Houseknecht, L. Godmilow, G. Bunin, C. Shields, A. Meadows and A. Ganguly, Sensitive multistep clinical molecular screening of 180 unrelated individuals with retinoblastoma detects 36 novel mutations in the RB1 gene, *Hum Mutat* **25** (2005), 566–574.
- [38] N. Ohtani-Fujita, T.P. Dryja, J.M. Rapaport, T. Fujita, S. Matsumura, K. Ozasa, Y. Watanabe, K. Hayashi, K. Maeda, S. Kinoshita, T. Matsumura, Y. Ohnishi, Y. Hotta, R. Takahashi, M.V. Kato, K. Ishizaki, M.S. Sasaki, B. Horsthemke, K. Minoda and T. Sakai, Hypermethylation in the retinoblastoma gene is associated with unilateral, sporadic retinoblastoma, *Cancer Genet Cytogenet* **98** (1997), 43–49.
- [39] G.A. Otterson, W. Chen, A.B. Coxon, S.N. Khleif and F.J. Kaye, Incomplete penetrance of familial retinoblastoma linked to germ-line mutations that result in partial loss of RB function, *Proc Natl Acad Sci USA* **94** (1997), 12036–12040.
- [40] M. Orjuela, V.P. Castaneda, C. Ridaura, E. Lecona, C. Leal, D. H. Abramson, I. Orlow, W. Gerald and C. Cordon-Cardo, Presence of the human papilloma virus in tumor tissue from children with retinoblastoma: An alternative mechanism for tumor development, *Clin Cancer Res* **6** (2000), 4010–4016.
- [41] M.A. Palazzi, J.A. Yunes, I.A. Cardinali, G.P. Stangenhaus, S.R. Brandalise, S.A. Ferreira, J.S.P. Sobrinho and L.L. Villa, Detection of oncogenic human papillomavirus in sporadic retinoblastoma, *Acta Ophthalmol Scand* **81** (2003), 396–398.
- [42] A. Raizis, R. Clemett, R. Corbett, J. McLaughran, J. Evans and P. George, Improved clinical management of retinoblastoma through gene testing, *N Z Med J* **115** (2002), 231–234.
- [43] S. Richter, K. Vandezande, N. Chen, K. Zhang, J. Sutherland, J. Anderson, L. Han, R. Panton, P. Branco and B. Gallie, Sensitive and efficient detection of RB1 gene mutations enhances care for families with retinoblastoma, *Am J Hum Genet* **72** (2003), 253–269.
- [44] M. Rodríguez, M. Salcedo, M. González, R. Coral-Vazquez, F. Salamanca and D. Arenas, Identification of novel mutations in the RB1 gene in Mexican patients with retinoblastoma, *Cancer Genet Cytogenet* **38** (2002), 27–31.
- [45] J. Sambrook and D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, 2001, Press, Cold Spring Harbor.
- [46] K. Sampieri, T. Hadjistilianou, F. Mari, C. Speciale, M.A. Mencarelli, F. Cetta, S. Manoukian, B. Peissel, D. Giachino, B. Pasini, A. Acquaviva, A. Caporossi, R. Frezzotti, A. Renieri and M. Bruttini, Mutational screening of the RB1 gene in

- Italian patients with retinoblastoma reveals 11 novel mutations, *J Hum Genet* **51** (2006), 209–216.
- [47] F. Sánchez-Sánchez, C. Ramírez-Castillejo, D.B. Weekes, M. Beneyto, F. Prieto, C. Nájera and S. Mittnacht, Attenuation of disease phenotype through alternative translation initiation in low-penetrance retinoblastoma, *Hum Mutat* **28** (2007), 159–167.
- [48] T.A. Sivakumaran, P. Shen, D.P. Wall, B.H. Do, K. Kucheria and P.J. Oefner, Conservation of the RB1 gene in human and primates, *Hum Mutat* **25** (2005), 396–409.
- [49] T. Shimizu, J. Togochida, M.V. Kato, A. Kaneko, K. Ishizaki and M.S. Sasaki, Detection of mutations of the RB1 gene in retinoblastoma patients by using exon-by-exon PCR-SSCP analysis, *Am J Hum Genet* **54** (1994), 793–800.
- [50] A. Schüler, S. Weber, M. Neuhäuser, C. Jurklics, T. Lehnert, H. Heimann, G. Rudolph, K.-H. Jöckel, N. Bornfeld and D.R. Lohmann, Age at diagnosis of isolated unilateral retinoblastoma does not distinguish patients with and without a constitutional RB1 gene mutation but is influenced by a parent-of-origin effect, *Eur J Cancer* **41** (2005), 735–740.
- [51] K.R. Schultz, S. Ranade, J.P. Neglia and Y. Ravindranath, An increased relative frequency of retinoblastoma at a rural regional referral hospital in Miraj, Maharashtra, India, *Cancer* **72** (1993), 282–286.
- [52] C.A. Stillier and D.M. Parkin, Geographic and ethnic variations in the incidence of childhood cancer, *Br Med Bull* **52** (1996), 682–703.
- [53] K. Sugano, T. Yoshida, H. Izumi, S. Umezawa, M. Ushiana, A. Ichikawa, A. Hidaka, Y. Murakami, T. Kodama, S. Suzuki and A. Kaneko, Outpatient clinic for genetic counseling and gene testing of retinoblastoma, *Int J Clin Oncol* **9** (2004), 25–30.
- [54] J.R. Valverde, J. Alonso, I. Palacios and A. Pestaña, RB1 gen mutation up-date, a meta-analysis based on 932 reported mutations available in a searchable database, *BMC Genetics* **6** (2005), 53.
- [55] D.W. Yandell, T.A. Campbell, S.H. Dayton, R. Petersen, D. Walton, J.B. Little, A. McConkie-Rosell, E.G. Buckley and T.P. Dryja, Oncogenic point mutations in the human retinoblastoma gene: their application to genetic counseling, *N Eng J Med* **321** (1989), 1689–1695.
- [56] Y.S. Yu, I.J. Kim, J.L. Ku and J.G. Park, Identification of four novel RB1 germline mutations in Korean retinoblastoma patients, *Hum Mutat* **18** (2001), 252.
- [57] X.L. Zhang, W.L. Fu, H.X. Zhao, L.X. Zhou, J.F. Huang and J.H. Molecular studies of loss of heterozygosity in Chinese sporadic retinoblastoma patients, *Clin Chim Acta* **358** (2005), 75–80.
- [58] X. Zhu, J.M. Dunn, A.D. Goddard, J.A. Squire, A. Becker, R.A. Phillips and B.L. Gallie, Mechanisms of loss of heterozygosity in retinoblastoma, *Cytogenet Cell Genet* **59** (1992), 248–252.