



11216
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO FAMILIAR, CLÍNICO Y CITOGENÉTICO
EN 14 PACIENTES CON RETINOBLASTOMA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO ESPECIALISTA EN

G E N E T I C A M E D I C A

P R E S E N T A :

MARGARITA VALDES FLORES

MEXICO, D. F.

JULIO, 1995



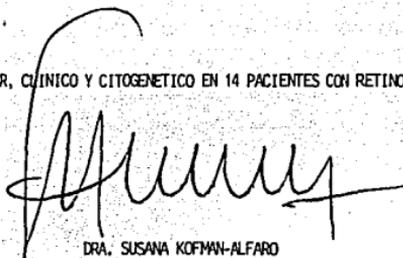
UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

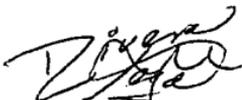
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

" ESTUDIO FAMILIAR, CLINICO Y CITOGENETICO EN 14 PACIENTES CON RETINOBLASTOMA"



DRA. SUSANA KOFMAN-ALFARO

JEFE DEL SERVICIO DE GENETICA, HOSPITAL GENERAL DE MEXICO
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIDAD EN GENETICA HUMANA.



DRA. MARIA DEL REFUGIO RIVERA VEGA

SECRETARIA DE SALUD
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO

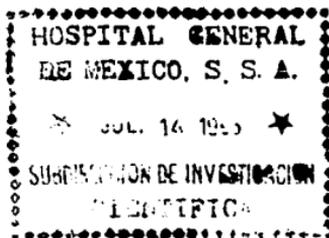
MEDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE GENETICA
TUTOR DE TESIS



DIRECCION DE ENSEÑANZA E
INVESTIGACION CIENTIFICA



ESTA TESIS FUE REGISTRADA Y REVISADA
POR LA UNIDAD DE EPIDEMIOLOGIA
DEL HOSPITAL GENERAL DE MEXICO
CON CLAVE; DIC/94/310 A/03/130.



CONTENIDO**I Introducción****1.-Condiciones que predisponen al cáncer**

- a).- Aneuploidias
- b).- Enfermedades mendelianas con predisposición al cáncer

2.- Susceptibilidad familiar al cáncer**3.- Neoplasias de origen embrionario****4.- Genes y cáncer**

- a).- Oncogenes con efecto dominante
- b).- Oncogenes con efecto recesivo

5.- Citogenética y cáncer**6.- Retinoblastoma**

- a).- Aspectos clínicos
- b).- Auxiliares de diagnóstico
- c).- Diagnóstico diferencial
- d).- Aspectos genéticos del retinoblastoma
- e).- Aspectos moleculares del gen de retinoblastoma
- f).- Gen del retinoblastoma y desarrollo embrionario

II.- Planteamiento del problema y justificación**III.- Objetivos****IV.- Material y métodos****V.- Resultados****VI.- Discusión****VII.- Conclusiones****VIII.- Bibliografía**

RESUMEN

La causa más frecuente de remoción de globos oculares en la infancia es la presencia de retinoblastoma. Es el tumor de origen embrionario más común, tiene un patrón de herencia autosómico dominante y una penetrancia del 90%. Su frecuencia en nuestro país no se conoce realmente. Aproximadamente 60% de los casos, son no hereditarios y unilaterales, 15% hereditarios y unilaterales y 25% hereditarios y bilaterales. Los pacientes con este tipo de tumores tienen un riesgo de 10% de presentar otro tipo de tumores mesenquimatosos, sobre todo osteosarcomas.

En este trabajo se analiza clínica y citogenéticamente una muestra de 14 pacientes mestizos mexicanos, en edad pediátrica con diagnóstico oftalmológico compatible con retinoblastoma en cualquiera de sus formas de presentación. El objetivo general del estudio es conocer el comportamiento del padecimiento en nuestro medio.

De los 14 pacientes estudiados 7 fueron del sexo femenino y el resto masculinos. Los rangos de edad al momento del diagnóstico variaron de 3 meses a 3 años 6 meses. El 78.57% de los casos fueron de origen no hereditario y 21.42% de presentación familiar. Se encontraron antecedentes familiares de tumores diferentes al retinoblastoma en 21.42 % de los casos analizados. El 71.42% de los pacientes mostraron afección en solamente uno de los globos oculares y en el resto (28.57%) la afección fue bilateral. Se reportó un solo foco tumoral en 64.28% de los casos y el 35.71% restante se relacionó con la presencia de más de un foco tumoral.

En todos los casos los signos y síntomas iniciales fueron la presencia de opacidad en uno o ambos globos oculares, leucocoria, estrabismo, movimientos oculares anormales e hiperemia conjuntival. El 42.85% de los casos presentaron protrusión del globo ocular afectado. Solamente en uno de los casos la tomografía axial de cráneo y orbitas fue anormal por la presencia de gran masa tumoral. En el

mismo caso se reportó la presencia de células tumorales en líquido cefaloraquídeo.

El estudio citogenético fue normal en 42.85% de los casos. El 28.57% revelaron la presencia de deleción constitutiva de 13q14, en uno de estos casos fue heredada de la madre, quien además presentó retinoblastoma bilateral. En 28.57% no fue posible la realización del estudio.

Los resultados de este trabajo son similares a los señalados por la literatura. Sin embargo, existen dudas sobre la forma de presentación real de algunos casos señalados como esporádicos. Estas dudas podrían resolverse empleando la nueva tecnología molecular, lo que permitiría a la vez proporcionar asesoramiento genético adecuado a los padres de estos pacientes.

I.--INTRODUCCION

En los últimos años el estudio bioquímico y molecular de la célula neoplásica ha mostrado grandes avances. Actualmente, se considera que los procesos neoplásicos se deben a modificaciones en el material genético que condicionan cambios en los mecanismos de regulación de la división, crecimiento, proliferación, muerte y otras funciones celulares. Esto condiciona en la célula grandes alteraciones morfológicas, bioquímicas, funcionales y antigénicas. Sin embargo, este proceso no ocurre en forma súbita, sino en forma gradual. Es así como las generaciones sucesivas de una célula previamente transformada, adquieren características irreversibles de malignidad, formando finalmente un agregado de células tumorales(1-4).

Estudios recientes de biología celular y molecular, han señalado que muchos de los cánceres humanos están ligados a la exposición a una serie de factores externos capaces de inducir mutación en células somáticas y/o germinales, favoreciendo así la transformación celular. Estos incluyen; agentes físicos (radiaciones ionizantes y no ionizantes), químicos (hidrocarburos aromáticos, óxido de etileno, hexacloroetano, cloramfenicol, fenilbutazona, etc.) y por último, agentes biológicos (algunos hongos, bacterias y virus). Todos estos factores se han relacionado con el desarrollo de leucemias principalmente(5-8).

Por otra parte, apoyándose en modelos matemáticos se ha postulado que para el desarrollo neoplásico se requieren al menos dos eventos celulares. A esto se le conoce como "Hipótesis de Knudson" que señala lo siguiente. En el caso de los tumores hereditarios la primera mutación ó evento inicial ocurre en células germinales y la segunda en células somáticas. Cuando se trata de tumores de presentación no hereditaria, ambas mutaciones ocurren en la misma célula somática. Cumpliéndose en ambos casos el postulado de los dos eventos(9), figura 1.

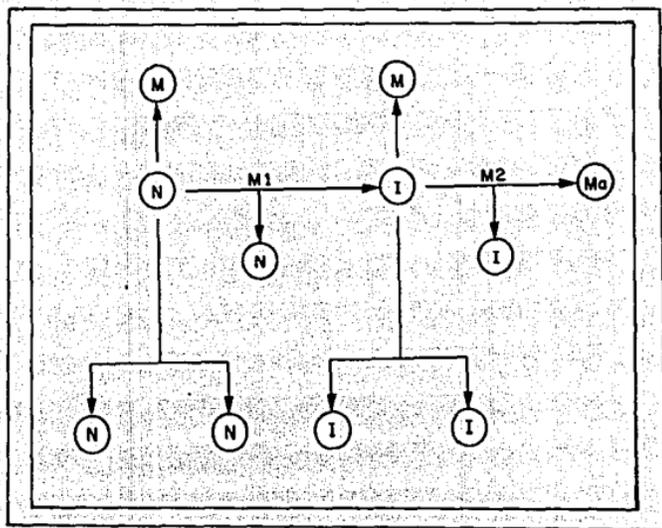


Figura 1. Modelo de los "Dos eventos" relacionados con la carcinogénesis.
 Knudson AG. 1971 (Ref. 9)

M= muerte celular, N= célula normal, I= célula en estado intermedio, M1= primera mutación, M2= segunda mutación, Ma= célula maligna.

Se considera que 90% de los individuos que heredan la primera mutación presentarán la segunda, condicionando así el desarrollo tumoral. El tiempo transcurrido entre los dos eventos, puede ser breve o muy largo. Knudson señala que las mutaciones ocurren con una frecuencia de 10^6 por día y pueden presentarse tanto en células somáticas como germinales. Sin embargo, la mayoría de ellas son inocuas para la célula, ya que en presencia de daño, ésta cuenta con un eficaz programa genéticamente determinado para su reparación(9-13).

Otra hipótesis igualmente aceptada es la propuesta por Matsunaga, que señala que la presentación del segundo evento depende de la resistencia del huesped a las neoplasias, misma que esta determinada por factores poligénicos y multifactoriales(14,15).

1.-CONDICIONES QUE PREDISPONEN AL CANCER

Se han identificado una serie de condiciones que favorecen el desarrollo neoplásico. Estas incluyen aneuploidías y algunos padecimientos mendelianos.

a).- ANEUPLOIDIAS

Existen una serie de cromosopatías numéricas y estructurales bien caracterizadas que predisponen el desarrollo tumoral. Los individuos con estas condiciones aneuploides desarrollan ciertos tipos de neoplasias con mayor frecuencia que la población general(16-22), cuadro I.

b).-ENFERMEDADES MENDELIANAS CON PREDISPOSICION AL CANCER

Se han descrito una serie de enfermedades genéticamente determinadas, con patrón de herencia mendeliano que presentan una mayor predisposición al desarrollo de neoplasias. Estas son consideradas estados preneoplásicos, en los que la primera mutación es responsable de la aparición de la enfermedad y constituye además el primer evento requerido para el desarrollo tumoral. Se han caracterizado algunos de los genes responsables de este grupo de enfermedades y sus productos son importantes para la regulación de los mecanismos de división, crecimiento, proliferación y muerte celular, así como para la respuesta inmune, reparación y síntesis del material genético(12,13,24-31). Los cuadros II,III y IV señalan algunas de estas entidades.

Cuadro I. Aneuploidías relacionadas con cáncer(16-22).

Condición Aneuploide	Neoplasia Relacionada
Trisomía 21	*Leucemias
Síndrome de Klinefelter	*Carcinomas de mama y células germinales
Trisomía 13	*Leucemias, teratomas y tumores neurogénicos
Trisomía 18	*Hepatoblastoma y tumores neurogénicos
Síndrome de Turner	*Gonadoblastoma, disgerminoma, y carcinoma de endometrio
Disgenesia gonadal pura 46,XX	*Gonadoblastoma y disgerminoma
Disgenesia gonadal mixta 45X/46,XY	*Gonadoblastoma y disgerminoma
Delección 13q14	*Retinoblastoma y otros tumores mesenquimatosos.
Delección 11p13	*Tumor de Willms
Delección 1p32-36	*Neuroblastoma

Cuadro II.- Enfermedades con patrón de herencia autosómico dominante con predisposición al cáncer(24-28).

Enfermedad	Localización cromosómica	Neoplasia relacionada	Tipo gen
Esófago de Barret	?	Adenocarcinoma de la unión gastroesofágica	?
Síndrome de Beckwith-Wiedemann	11p15	Tumor de Willms	1
Neurofibromatosis I	17q11	Neurofibrosarcoma	1
Neurofibromatosis II	22q11	Neurinoma acústico	1
Gigantismo cerebral (S x. de Sotos)	?	Hamartomas, cáncer hepatocelular y poliposis intestinal	?
Poliposis de colón familiar (Sx de Gardner)	5q21	Adenocarcinoma de colón hepatoblastoma y otros tumores gastrointestinales	1
Adenomatosis endocrina múltiple I.	11q13	Cáncer de páncreas, paratiroides y hipófisis	?
Adenomatosis endocrina múltiple II A y B	10q11.2	Carcinoma medular de tiroides y feocromocitoma.	2
Síndrome nevo basal	9q22.3	Cáncer de células basales, meduloblastoma y fibroma de ovario.	1
Paraganglioma hereditario	11q(?)	Paraganglioma	1
Esclerosis tuberosa	9q34 16p13	Angiofibrosarcomas, cáncer, renal, rabdomiosarcoma y angiomiolipoma	1
Tilosis	?	Cáncer de esófago	?
Enfermedad de Von Hippel Landau	3p25	Cáncer renal, SNC, retina, hemangioblastoma y feocromocitoma	1

1= Gen Tumor Supresor

2= Oncogén con efecto dominante

?= Se desconoce

**Cuadro III.- Desórdenes en la síntesis y reparación del DNA
(Síndromes de Inestabilidad Cromosómica(29))**

Enfermedad	Localización	Función	Neoplasia
Ataxia telangiectasia	11q22	Reparación	Leucemias, cáncer de ovario, gástrico y epiteliales
Síndrome de Bloom	15q26	Reparación (Replicación)	Leucemias, linfomas, tumores epiteliales.
Anemia de Fanconi	20q	Reparación	Leucemias
Grupos A-B-C-D	9q22		
Incontinentia Pigmenti	Xp11	?	Múltiples tumores.
Xeroderma Pigmentoso	9q34	Reparación	Carcinoma de piel y mucosas.
	A	?	
	B	2q21	
GRUPOS	C	?	
	D	19q13	

* = Defecto en la reparación de DNA por daño a la luz ultravioleta.

**Cuadro IV . Inmunodeficiencias hereditarias con predisposición al
cáncer(30) .**

Enfermedad

Agamaglobulinemia tipo Bruton	RLX	Xq21	Leucemias, linfomas y cáncer de colon.
Hipogamaglobulinemia con déficit de hormona del crecimiento.	RLX	?	No especificada
Inmunodeficiencia común variable	AR(?)	?	Leucemias y adenocarcinomas
Déficit de inmunoglo- bulinas con aumento de IgM	RLX	?	Anemia aplásica y linfomas
Síndrome de Wiskott- Aldrich	RLX	Xp11.2	Leucemia mieloide crónica, linfomas y tumores de SNC.
Enfermedad de Chediak- Higashi	AR		Leucemias y linfomas
Inmunodeficiencia severa combinada.	RLX	20q(?)	Leucemias y linfomas

I= Patrón de herencia

II= Localización cromosómica del gen implicado

III= Neoplasia relacionada

2.-SUSCEPTIBILIDAD FAMILIAR AL CANCER

A pesar de que la mayoría de las neoplasias son de presentación esporádica, existen casos que exhiben cierta tendencia familiar para la presentación de algunos tipos de cáncer. Algunos ejemplos lo constituyen las neoplasias endocrinas múltiples (NEM), síndromes de Li-Fraumeni, Linch y carcinomas de mama, ovario y próstata. Los genes implicados en este tipo de neoplasias pertenecen principalmente al grupo de genes tumor supresor (GTS) y presentan una penetrancia de 50%. La mutación de estos genes, no es aparentemente una condición suficiente para el desarrollo neoplásico y existen aún preguntas relacionadas con la naturaleza y número de eventos somáticos subsecuentes requeridos para el desarrollo tumoral(26,28,31-33).

Es importante señalar que existen familias que además de la susceptibilidad al desarrollo de ciertos tipos de cánceres, presentan fenómeno de anticipación clínica. Es decir, la edad de inicio de la enfermedad en los hijos afectados, es más temprana que en los padres, y en general, el grado de afección es mayor. Esto podría explicarse por un proceso molecular denominado "imprinting" que se relaciona con diferencias en la metilación de secuencias específicas de DNA. Lo que condiciona a su vez cambios en la estructura de la cromatina y la expresión de los genes. Se propone que esto ocurre durante la gametogénesis y refleja que los procesos fisiológicos y bioquímicos de la meiosis masculina y femenina son diferentes(34-40).

Los GTS, como el resto de los genes son susceptibles de inactivación por "imprinting". Esto corresponde en algunos casos al primer evento mutacional requerido para el desarrollo tumoral, como lo señala Knudson en su hipótesis de la carcinogénesis(9). En el cuadro V se señalan algunos de los genes relacionados con la susceptibilidad familiar al cáncer y en las figuras 2 y 3 se observan algunos árboles genealógicos en los que se aprecia la coexistencia de ciertos tipos de tumores y fenómeno de anticipación clínica.

Cuadro V. Genes de susceptibilidad familiar al cáncer(27,28,31)

Gen	Localización	Neoplasia
APC	5q21.22	Poliposis familiar
DCC	18q21	Cáncer de colon
BRCA1	17q12.21	Cáncer de mama, ovario y próstata.
CMAR/CAR	16q	Cáncer de mama y próstata
MEN 1	11q13	Cáncer de páncreas, glándulas adrenales y tiroides.
MLM	9p21	Melanoma familiar
NB	9q34	Nevo basal
P53	17p13	Prácticamente todos los tipos de cáncer y algunos síndromes de cáncer familiar (Lynch, Li-Fraumeni).
MSH2	2p16	Cáncer de colon, endometrio, mama y ovario.
RET	10q11.2	Cáncer medular de tiroides y feocromocitoma.

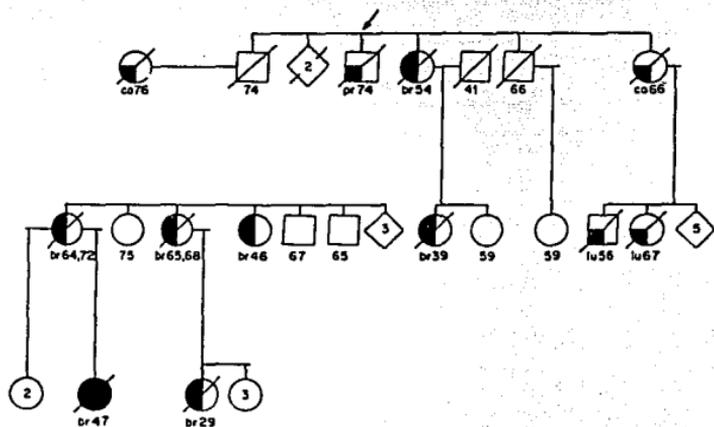


Figura 2.- Cáncer familiar y fenómeno de "imprinting"
 Arason P A. y cols 1993 (Ref. 37)

lu= cáncer pulmonar, pr= cáncer de prostata, br= cáncer de mama (unilateral), co= cáncer de colon.

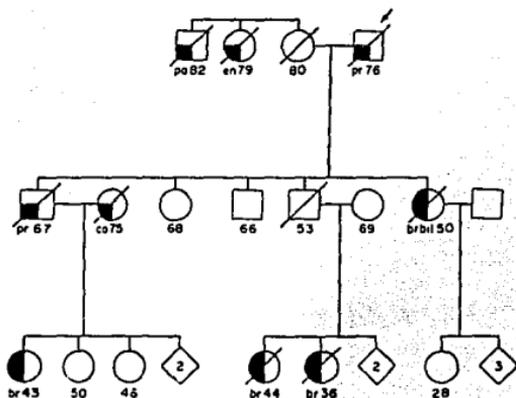


Figura 3. Cáncer familiar y fenómeno de "imprinting"
 Arason P A y cols. 1993 (Ref 37)

pa= cáncer de páncreas, en= cáncer de endometrio, pr= cáncer de próstata, co= cáncer de colon, br= cáncer de mama (unilateral), br bi= cáncer de mama (bilateral).

3.-NEOPLASIAS DE ORIGEN EMBRIONARIO

Existe un grupo de tumores de origen embrionario con patrón de herencia autosómico dominante y características peculiares. Este grupo incluye retinoblastoma, nefroblastoma y neuroblastoma(9-12).

Los casos hereditarios representan 30-40% de los casos aproximadamente. Son generalmente de inicio temprano, bilaterales y se relacionan con la presencia de múltiples focos tumorales. En ellos la primera mutación puede ocurrir en células germinales o ser heredada en forma dominante, condicionando así el estado heterocigoto. Posteriormente, ocurre una segunda mutación en las células somáticas de los tejidos afectados. El resto de los casos son de presentación esporádica, de inicio tardío, unilaterales y unifocales. En ellos las dos mutaciones ocurren en células somáticas. En ambos casos la pérdida de la función del segundo alelo podría ocurrir a través de diferentes mecanismos, condicionando así pérdida del estado heterocigoto y desarrollo tumoral(9-13), figura 4. Los genes reponsables de estas neoplasias, pertenecen al grupo de los genes tumor supresor y su función más importante es la regulación de la división, proliferación y muerte celular(30-32), cuadro VI.

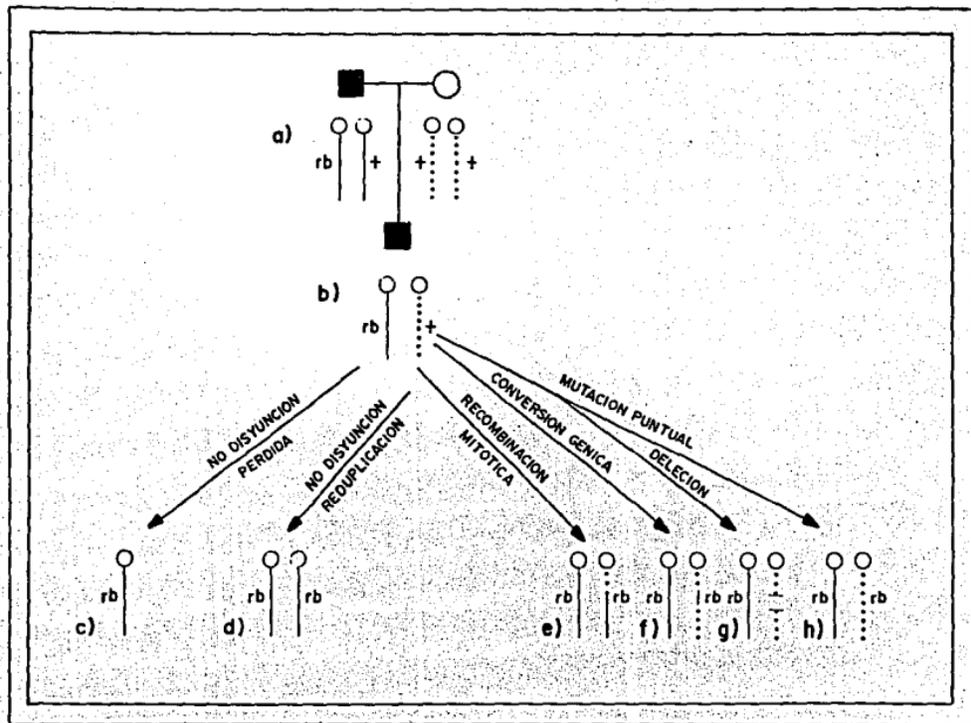


Figura 4. Mecanismos relacionados con pérdida de la heterociguidad.
Cavenee y cols. 1983 (11).

CUADRO VI. Neoplasias de origen embrionario y genes responsables de su presentación(28).

Neoplasia	Gen	Localización Cromosómica	Función del producto
Retinoblastoma	RB1	13q14	Control ciclo celular Importante para la neurogénesis y hematopoyesis
Tumor de Wilms	WT1	11p13	Participa en desarrollo normal del sistema genitourinario
Neuroblastoma	NB	1p36	Se ignora

4.-GENES Y CANCER

Rous publicó el primero de una serie de trabajos que demostraba la transformación maligna de células normales de pollo, mediante transfección con el virus que ahora se conoce como "virus del sarcoma de Rous". Desde entonces, se han identificado gran cantidad de virus de DNA y RNA con potencial oncogénico. Algunos de ellos se relacionan en forma directa con el desarrollo de ciertas neoplasias en humanos(41), cuadro VII.

Se han identificado en eucariontes, secuencias de DNA similares a las de los oncogenes aislados de retrovirus. Se conocen como oncogenes celulares o protooncogenes y están distribuidos en todo el genoma humano. Se ha demostrado que estos oncogenes provienen del genoma del huésped y fueron posteriormente adquiridos por los retrovirus. Estos oncogenes están implicados en los rearrreglos estructurales característicos de los procesos neoplásicos, existiendo una estrecha correlación entre su localización y los sitios frágiles(41-43).

En la actualidad gracias a la nueva tecnología molecular es posible, conocer los genes implicados en el origen del cáncer y su papel en el funcionamiento celular normal. Los genes relacionados con el desarrollo neoplásico tienen características especiales. A continuación se describen los aspectos más importantes de estos grupos de genes.

a).-ONCOGENES CON EFECTO DOMINANTE

Los genes relacionados directamente con el cáncer (oncogenes), están presentes en todas las células y participan en la regulación de las funciones celulares normales. Sin embargo, cambios cuali ó cuantitativos en su función condicionados por mutaciones, amplificaciones, rearrreglos cromosómicos o bien formación de

Cuadro VII . Virus relacionados con neoplasias en humanos (41) .

Familia Viral	Virus	Número de genes	Tipo	Tamaño genoma	N. relacionada
Retrovirus	HTLV1	5	CS RNA	8 Kb	Leucemia
Hepadnavirus	HBV*	5	CD DNA circular	3 Kb	Hepatoma
Papiloma	HPV**	10 16, 18 y 31	CD DNA	9 Kb	Carcinoma cervico uterino
Herpes virus	EIV	100	CD DNA	130 Kb	Linfoma de de Burkit

CS = Cadena sencilla

CD = Doble cadena

* = Virus de hepatitis B

** = Virus del papiloma humano

Kb = Kilobases

productos quiméricos a través de su fusión con otros favorecen el desarrollo neoplásico(27,44-47).

Actualmente se ha identificado un número importante de este tipo de genes. Sus productos están implicados en el crecimiento y proliferación celulares, sobre todo durante la embriogénesis. Estos oncogenes incluyen una serie de proteínas con actividad de cinasas, factores de crecimiento, receptores para factores de crecimiento, algunos extracelulares y otros transmembranales. Otros más incluyen proteínas citoplasmáticas que actúan transmitiendo señales al núcleo, además de factores de transcripción y otras proteínas implicadas en la replicación del DNA. La cooperación entre ellos es importante para mantener el estado maligno celular(44-53), cuadro VIII y figura 5.

Se ha descubierto un nuevo mecanismo regulatorio de la expresión de algunos oncogenes de acción en núcleo. Parecería ser que algunas hormonas esteroideas juegan un papel importante en la regulación de su expresión, a través de la presencia de secuencias relacionadas con elementos de respuesta a hormonas. Estas secuencias forman parte de algunos oncogenes como c-fos, c-jun y c-myc(54). El empleo de las nuevas técnicas de biología molecular y el estudio de estas oncoproteínas permitirá el conocimiento de la función de sus productos y la forma en que favorecen el desarrollo neoplásico.

b).-ONCOGENES CON EFECTO RECESIVO

Otro grupo de genes relacionados con cáncer son los oncogenes con efecto recesivo, antioncogenes o Genes Tumor Supresor (GTS). Su función es reprimir el crecimiento y proliferación celulares. A diferencia de lo que ocurre con los oncogenes de efecto dominante es necesaria la pérdida de función de los dos alelos para que se presente el desarrollo tumoral. Actualmente, se conocen en forma precisa los mecanismos moleculares mediante los cuales este grupo de genes controla las funciones celulares(32,36,55,56). Estos genes

muestran gran conservación evolutiva y algunos tienen secuencias específicas que les permiten interactuar con los productos de otros oncogenes y oncoproteínas virales(55,56).

La mayoría de las mutaciones reportadas en este grupo de genes(RB1,NF1,WT1, etc) son deleciones. Sin embargo, el oncogen P53, mutado en la mayoría de los cánceres humanos, presenta generalmente mutaciones puntuales(55), cuadros II,VI y VI.

Se han reportado nuevas funciones de este grupo de genes, como son la regulación de los mecanismos de división celular durante la embriogénesis y la diferenciación terminal de algunas líneas celulares. Por ejemplo, el gen de Retinoblastoma (RB1) que se expresa casi en todos los tejidos participa en la neurogénesis y hematopoyésis sobre todo de línea eritroide y es importante para la diferenciación de los miocitos(56).

El gen relacionado con el tumor de Wilms (WT1) se expresa en todos los tejidos y muestra una sobreexpresión en sistema genitourinario, bazo, células hematopoyéticas y es indispensable para el desarrollo normal del sistema genitourinario. Esto se ha confirmado al detectar mutaciones en este gen en pacientes con el síndrome de Denish-Drash, quienes cursan principalmente con ambigüedad genital. También se encuentra mutado en pacientes con síndrome de Beckwith-Wiedeman quienes presentan desarrollo genitourinario anormal, sobrecrecimiento somático y visceral y predisposición al desarrollo de nefroblastoma(57-61).

Un ejemplo más lo constituye el gen responsable de la neurofibromatosis tipo I (NF1) cuyo producto se ha denominado neurofibromina y es importante para el desarrollo cerebral y de cordón espinal. Existen dos isoformas de esta proteína, productos de procesamiento alternativo de los RNAm. Estudios en embriones de pollo y ratón muestran que una de las isoformas es importante para el desarrollo y diferenciación normal de cerebro y la segunda se expresa transitoriamente en los miotomos. Esto podría explicar de alguna

manera la presencia de enfermedad cardiaca en algunos pacientes con neurofibromatosis tipo I. Sin embargo, la relación entre la expresión de esta isoforma en músculo y algunas manifestaciones clínicas de estos pacientes no son del todo claras(62-66).

Por otra parte, los productos de algunos de estos oncogenes como P53 son importantes para la regulación de la muerte celular programada (Apoptosis), esto ocurre durante el desarrollo embrionario y en la vida adulta, con el objeto de mantener las poblaciones celulares y como elemento de respuesta al daño celular(67-69).

Cuadro VIII Oncogenes con efecto dominante.

CLASIFICACION ACORDE A SU FUNCION BIOQUIMICA(44-53)

I.-Factores de crecimiento

v-sis
int 2
KS3
hst
int-1

**II.- Receptores con poca actividad de protein-cinasa
mas**

**III.-Tirosin-cinasas, proteinas integradas a membrana,
receptores de factores de crecimiento.**

v-erb B
v-fms
v-kyt
v-ros
met
trk
neu
ret

IV.- Tirosin-cinasas, asociadas a membrana

v-src
v-yes
v-fps
v-fes
v-ros
lck
v-abl

V.- Proteina G asociada a membrana

v-H-ras, v-K-ras, N-ras

VI.- Serin-treonin-cinasas citoplasmáticas

v-mos
v-raf
pim-1

VII.-Reguladores citoplasmáticos

v-crk
vav

VIII.- Proteinas de acción en núcleo

v-myc, N-myc, L-myc
v-myb
v-fos
v-jun
v-ski
v-ets
P53

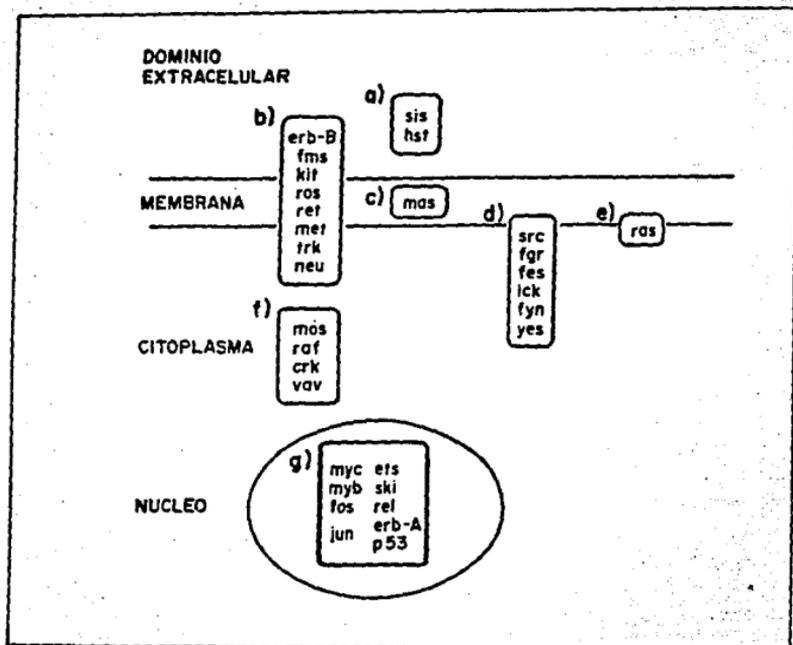


Figura 5. Localización celular de los productos de algunos oncogenes.

Modificado de: Rowley J D. y cols. 1993 (Ref. 47)

a).- factores de crecimiento, b).- receptores transmembranales para factores de crecimiento, c).- receptores integrados a membrana para factores de crecimiento, d).- proteínas asociadas a membrana con actividad de tirocin-cinasa, e).- proteínas G asociadas a membrana, f).- oncogenes citoplasmáticos, g).- oncogenes de acción en núcleo (factores de transcripción.)

5.-CITOGENETICA Y CANCER

Desde finales del siglo pasado se relacionó la presencia de anomalías nucleares y mitóticas con el desarrollo neoplásico. Posteriormente, Boveri en 1914 postuló que las aberraciones cromosómicas eran los cambios celulares primarios que condicionaban la transición del estado normal a maligno (70). A partir de mediados del presente siglo, la metodología citogenética marcó una nueva etapa en el estudio de los cromosomas humanos, permitiendo el estudio citogenético de los procesos neoplásicos(47,71).

En 1960 se reporta la primera anomalía cromosómica observada en neoplasias, que corresponde al llamado cromosoma Filadelfia (Ph), el cual se detecta citogenéticamente en 80-90% de los casos de leucemia granulocítica crónica(72). Este cromosoma es producto de una translocación balanceada entre los cromosomas 9 y 22. Este rearrreglo se conoce como $t(9;22)(q34;q11)$ (47,71). Actualmente, se han documentado gran número de rearrreglos cromosómicos que caracterizan a ciertos tipos de neoplasias humanas. El estudio de las aberraciones cromosómicas, tanto numéricas como estructurales características de los diferentes procesos tumorales permiten establecer su diagnóstico, pronóstico y algunas veces el tratamiento adecuado. Por ejemplo, en las neoplasias de origen hematopoyético es frecuente encontrar aumento (hiperdiploidía) o disminución (hipodiploidía) del número cromosómico, además de cambios estructurales balanceados (translocaciones e inversiones), mientras que en los tumores sólidos son comunes las aberraciones estructurales, sobre todo deleciones(43,47,71).

Por otra parte, las técnicas de citogenética de alta resolución y moleculares, han permitido la identificación precisa de las regiones cromosómicas implicadas en los rearrreglos cromosómicos, facilitando además la identificación de nuevos genes implicados en cáncer(47,72).

6.-RETINOBLASTOMA

El retinoblastoma es el tumor ocular de origen embrionario más común en los niños y afecta los conos y bastones de la retina. La frecuencia reportada en Estados Unidos de Norteamérica es de 1:20,000 RNV. Sin embargo, la incidencia en nuestro país no se conoce, a pesar de ser la causa más común de remoción de globos oculares en la infancia(73-75).

a).- ASPECTOS CLINICOS

Aunque la enfermedad puede ser aparente al nacimiento generalmente se diagnostica entre el primer y tercer año de vida, casi siempre antes de los siete y raramente en la pubertad. Pocos casos son detectados en valoraciones de rutina(74-76).

En la mayoría de los casos el primer signo es el llamado "reflejo de ojo de gato" y es resultado de la opacidad del vítreo por el tumor. Otros datos son; estrabismo, leucocoria, celulitis orbital, edema palpebral, heterocromía del iris, queratitis, quistes retinianos y hemorragia vítrea. Puede existir uveítis atípica y se asocia particularmente a la presencia de glaucoma(76-78).

b).-AUXILIARES DE DIAGNOSTICO

Dentro de los auxiliares de diagnóstico de mayor utilidad se encuentran la tonometría y el ultrasonograma ocular. Es conveniente realizar en todos los casos tomografía axial computarizada de órbitas y SNC, simple y contrastada y en casos especiales resonancia magnética nuclear de las mismas regiones(76,-78). La valoración neurológica es importante y se sugiere la realización de punción

lumbar con el fin de realizar análisis completo bioquímico y citológico de líquido cefalorraquídeo, ya que la invasión a coroides y esclera representan un vehículo efectivo que favorece las metastásis a distancia sobre todo a sistema nervioso central a través de la invasión al nervio óptico y espacio meníngeo(76-80).

Dentro de los estudios genéticos se realiza en algunos casos determinación de actividad enzimática de Esterasa D, así como estudio citogenético con técnica de alta resolución en el paciente y sus padres con el fin de detectar la presencia de la deleción constitutiva de 13q14, presente en 10-15% de los casos(76-78). Los estudios moleculares tanto en sangre como en células tumorales son de utilidad, ya que permiten detectar alteraciones a nivel génico(77,78).

c).-DIAGNOSTICO DIFERENCIAL

El diagnóstico diferencial del retinoblastoma debe realizarse con las siguientes entidades(76):

I.- Enfermedades hereditarias, no neoplásicas

Enfermedad de Norrie
Retinosquiasis
Incontinencia pigmenti
Vitreoretinopatía familiar exudativa
Cataratas

II.- Enfermedades no hereditarias y no neoplásicas

Cataratas
Displasia retiniana
Coloboma retiniano
Enfermedad de Coat

III.-Condiciones inflamatorias

Toxoplasmosis congénita
 Inclusión por citomegalovirus
 Herpes simple
 Uveítis
 Celulitis orbital

IV.- Neoplasias

Leucemia
 Hamartoma astrocítico
 Meduloepitelioma
 Hemangioma coroidal o retiniano

d).- ASPECTOS GENETICOS DEL RETINOBLASTOMA

El retinoblastoma ha sido el ejemplo prototipo que ha permitido estudiar la predisposición genética al cáncer, a pesar de que la mayoría de los casos no revelan historia familiar. Su forma de herencia ha sido bien estudiada y documentada. Estudios epidemiológicos han estimado que 60% son no hereditarios y unilaterales, 15% hereditarios y unilaterales y 25% hereditarios y bilaterales. Los casos hereditarios muestran un patrón de herencia autosómico dominante con penetrancia de 90% y un riesgo de 10% de presentar tardíamente otras neoplasias de tipo mesenquimatoso, sobre todo osteosarcomas. Los casos de presentación familiar son de inicio temprano (antes del año de edad), bilaterales y multifocales. Mientras que los no hereditarios son generalmente de inicio tardío, unilaterales y relacionados con un solo foco tumoral(9-12). Por otra parte, Bader y cols. acuñaron el término "retinoblastoma trilateral" para describir la asociación de retinoblastoma con tumores de la línea media, generalmente hipofisarios. Observaciones similares

sugieren que la participación de la hipófisis (tercer ojo), representa el origen real de los retinoblastomas multicéntricos. Esto podría explicarse porque el SNC es el sitio más frecuentemente afectado por la presencia de metástasis provenientes del retinoblastoma, (79,80).

e).--ASPECTOS MOLECULARES DEL GEN DE RETINOBLASTOMA

La localización del gen de retinoblastoma fue planteada por Yunis. Quien estudiando células tumorales de retinoblastos, encontró la pérdida de la banda q14 del cromosoma 13, sugiriendo que esta anomalía confería ventaja proliferativa a las células neoplásicas. Además propuso a esta región como candidata para la localización del gen de retinoblastoma(80,81). Sin embargo, la delección constitutiva de 13q14 sólo se encuentra presente en 10-15% de los casos, y se pone de manifiesto al emplear técnicas citogenéticas de alta resolución. Al gen candidato localizado en esta región cromosómica se le denominó RB1(81,83).

Posteriormente, mediante estudios de ligamiento empleando como marcador cromosómico específico el gen de la Esterasa D, se logró precisar la región del candidato a gen (84-86). Estos trabajos culminaron con la clonación de su cDNA por Drya, Friend y Weinberg en 1986 (87). Este gen pertenece al grupo de los genes tumor supresor, u oncogenes con efecto recesivo, en los que la pérdida de su función condiciona el desarrollo tumoral y participa en la regulación de la progresión del ciclo celular y la diferenciación terminal de algunas líneas celulares, sobre todo durante la embriogénesis(88).

El gen RB1 codifica para una fosfoproteína nuclear de aproximadamente 105-110 kDa que se expresa en casi todos los tejidos(88-91). Las características del gen, su transcrito y producto se señalan en la figura 6. La actividad de p105-110 está relacionada con el ciclo celular, bloqueando la progresión de la fase G1 a S. Esto ocurre

mediante la fosforilación de residuos específicos de serina y treonina en su producto, por cinasas dependientes de ciclinas, sobre todo cdc-2 ((91-94).

La forma fosforilada permite la entrada a S, mientras que la defosforilada o poco fosforilada bloquea el paso de G1 a S (88-91), figura 7. Por otra parte p105-110 tiene secuencias específicas que le permiten interactuar con otras proteínas como el factor de transcripción E2F(95), el factor activador de la transcripción ATF2, Myc D y los oncogenes c-abl, c-myc, N-myc y neu(88-91,96-100).

Además, el producto del gen RB1 puede interactuar con oncoproteínas virales como el antígeno T de SV40, la proteína E7 del virus del papiloma humano y E1A de adenovirus(89-91,96-100). Estas interacciones permiten al producto del gen de retinoblastoma controlar la entrada a la fase S del ciclo celular, permitiendo la disposición de factores de transcripción requeridos para la entrada a S del ciclo celular, figura 8.

Es importante señalar que la región del extremo COOH incluye una secuencia con capacidad de unión al antígeno T de SV40 y E1A de adenovirus y es importante no solo para la actividad del gen como GTS sino para que cumpla su función durante el desarrollo embrionario(89-91,96).

Recientemente se reportó la interacción de p105-110 con la proteína BRG1, miembro de una rara familia de activadores de la transcripción. Estas proteínas cooperan entre sí para inducir arresto celular y es posible que este complejo proteico RB1- BRG1 condicione cambios en la estructura de la cromatina, interfiriendo con la regulación de la transcripción de genes importantes para la progresión del ciclo y diferenciación celulares(101).

Se han reportado gran cantidad de mutaciones en el gen RB1, no solamente en pacientes con retinoblastoma, sino también en otros tipos de neoplasias como osteosarcomas, cáncer de mama, próstata,

ovario, vejiga, carcinoma pulmonar de células pequeñas y algunas leucemias(101-105).

La mayoría de las mutaciones reportadas en el gen Rb1 son deleciones y comprenden los exones 13-17 y 21-24 y el resto son mutaciones puntuales(101-105). Se ha propuesto que es posible la pérdida de la función de este gen como consecuencia de hipermetilación (imprinting), sobre todo en la región promotora, dando como resultado el desarrollo tumoral (106).

f).-PAPEL DEL GEN Rb1 EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO

El producto de Rb1 controla la progresión del ciclo celular, el desarrollo y diferenciación terminal de ciertas líneas celulares, sobre todo durante la embriogénesis. Estudios realizados en embriones transgénicos de ratones deficientes en el gen Rb1, revelan que este gen juega un papel importante en el desarrollo de SNC y hematopoyesis sobre todo de línea eritroide(107,108).

Se han creado ratones con disrupción de uno de los alelos del gen de Rb1 (Rb+/Rb-), estos heterocigotos no muestran predisposición al desarrollo de retinoblastoma, pero exhiben alto riesgo de presentar tumores de la hipófisis cuando uno de los alelos silvestres está ausente. Por otra parte, los embriones homocigotos (Rb-/Rb-) para este gen mueren entre los días 14-15 de gestación y presentan un exceso de muerte neuronal así como eritropoyesis deficiente(107,108).

El análisis histológico de estos ratones revela un aumento importante de muerte neuronal, particularmente en cordón espinal, raíz de ganglios dorsales y porciones de cerebro superior. La muerte celular en estos tejidos no parece estar condicionada por hipoxia tisular secundaria a eritropoyesis deficiente. Se ha estudiado

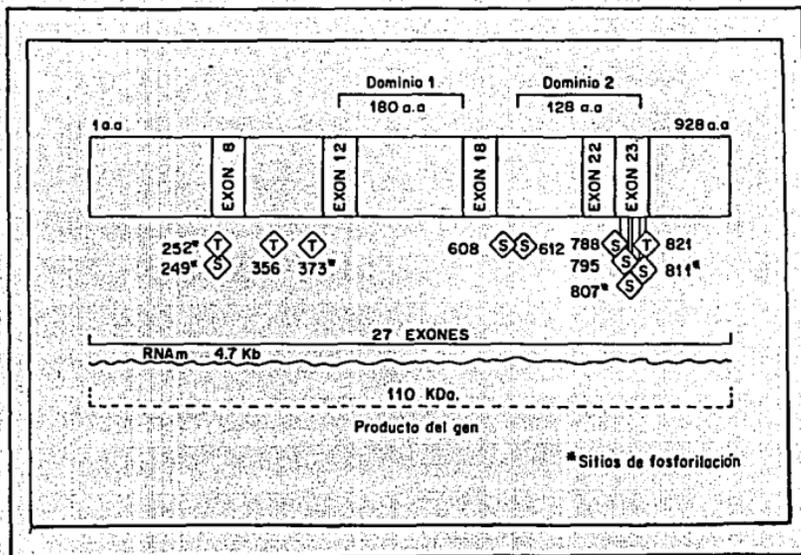


Figura 6. Características del gen, transcrito y producto del retinoblastoma (RB1).
Modificado de Hamel P A y cols. 1992 (Ref. 90)

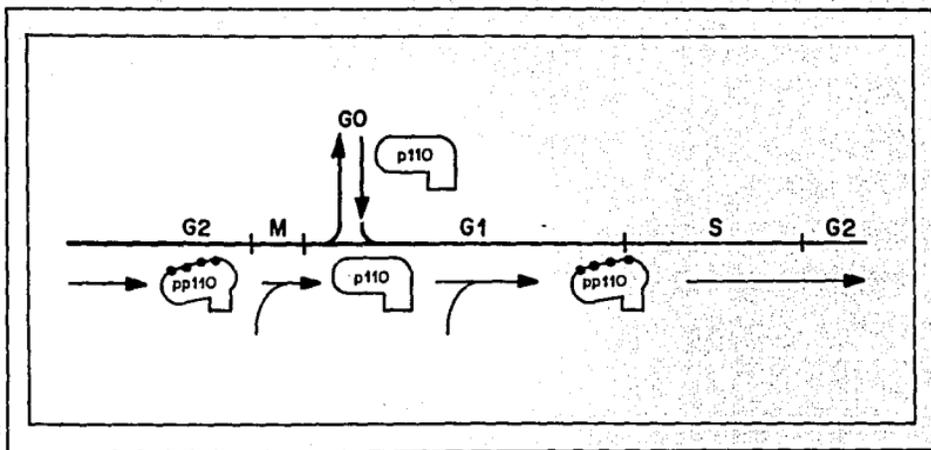


Figura 7. Actividad de p105-110 durante el ciclo celular dependiendo de su estado de fosforilación.
Modificado de Hamel P A y cols. 1992 (Ref. 90)

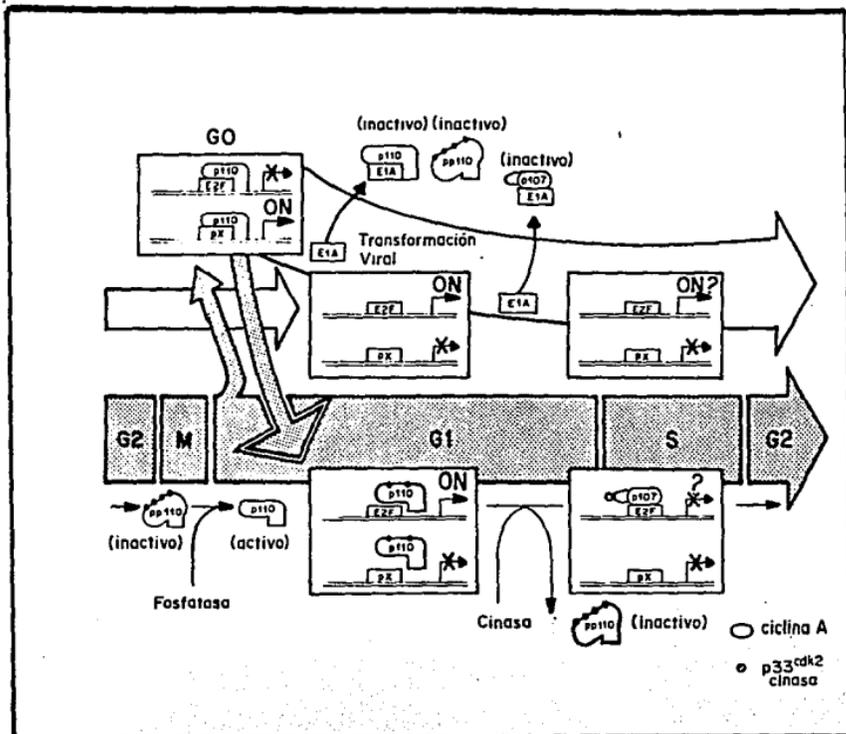


Figura 8. Actividad de p110 durante el ciclo celular dependiendo de su estado de fosforilación, interacción con factores de transcripción y oncoproteínas virales. Modificado de Hamel P A y cols. 1992 (Ref.90)

II-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION

El retinoblastoma es el tumor ocular de origen embrionario más común y la causa más frecuente de remoción de globos oculares en la infancia. En nuestro medio no existen estudios que analicen las características de esta entidad de una manera integral.

El presente trabajo plantea el estudio clínico y citogenético de una muestra de pacientes con retinoblastoma de población mexicana y sus padres, analizando las siguientes características: Formas de presentación esporádica o familiar, unilateral o bilateral y unifocal o multifocal. Además de la identificación citogenética de los casos con delección constitutiva de 13q14.

III.OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Identificar las características clínicas y citogenéticas del retinoblastoma en una muestra de pacientes con retinoblastoma de población mestiza mexicana.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

IDENTIFICAR:

- 1.- Los casos de retinoblastoma de presentación esporádica y familiar.
- 2.- Los casos con uno o varios focos tumorales.
- 3.- Los casos con afección unilateral y bilateral.
- 4.- La frecuencia de afección en relación al sexo, edad del paciente al momento del diagnóstico y signos y síntomas más frecuentes.
- 5.- Casos que muestran constitutivamente la delección de 13q14. y si ésta es heredada.
- 6.- Proporcionar asesoramiento genético a la familia.

IV.-MATERIAL Y METODOS

A.- PACIENTES

a).- POBLACION Y MUESTRA.

Para la realización del presente estudio se estudiaron 14 pacientes con diagnóstico clínico y oftalmológico compatible con retinoblastoma en cualquiera de sus formas de presentación. Se capturaron en las áreas de consulta externa y hospitalización de las unidades de oftalmología, hematocología pediátrica y genética del Hospital General de México, SSA y del Servicio de Genética del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

b).- Los pacientes incluidos en el presente estudio fueron seleccionados bajo los siguientes criterios.

* INCLUSION:

Pacientes con diagnóstico clínico oftalmológico de retinoblastoma.

* EXCLUSION:

Pacientes con patología ocular diferente al retinoblastoma.

* ELIMINACION:

Se eliminaron aquellos pacientes en quienes no se fue posible confirmar el diagnóstico clínico de retinoblastoma y quienes no desearon participar en el estudio.

ASPECTOS ETICOS.- En todos los casos se obtuvo carta de consentimiento informado de los padres, para participar en el estudio (Anexo 1).

c).- INVESTIGACION CLINICA

En cada uno de los casos se realizó historia clínica genética y revisión de resultados de estudios auxiliares de diagnóstico realizados por los servicios tratantes.

d).- CULTIVO DE LINFOCITOS CON TECNICA DE ALTA RESOLUCION(112,113)

Se obtienen mediante punción venosa 5-10 ml de sangre periférica en jeringa previamente heparinizada del paciente, sus padres y en algunos casos de sus hermanos para cultivo de alta resolución. Se agrega 1ml de la muestra a un tubo de polipropileno, que contiene 5ml de medio de cultivo RPMI 1640, suplementado con suero de ternera fetal al 10%, además de mezcla de antibióticos (penicilina con estreptomocina). Se agregan además 0.1 ml de fitohemaglutinina. Se incuba la preparación durante 48 horas a 37° C. Posteriormente, se agregan 50 ul de metrotexate .10nM durante 17 horas. Al final de este tiempo se realizan 2-3 lavados con solución de Hanck, centrifugando a 3000 rpm durante 5 min. Se reconstituye el paquete celular con 5 ml de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado y 100 ul de BrdU (5-bromodeoxiuridina) a una concentración de 2 mM. Se incuba durante 4-5 horas a 37° C. Se agregan 0.5 ml de colchicina 0.02 % y se incuba la muestra 15 minutos a 37° C. Se centrifugan las muestras a 3000 rpm durante 5 minutos, se decanta el sobrenadante y se agregan 5 ml. de solución hipotónica (KCl a 0.075 M) a 37°. Se incuba 30 minutos a 37° C. Se centrifugan las muestras a 3000 rpm durante 5 min, se decanta el sobrenadante y se agregan gota a gota agitando en vortex 5 ml de fijador (metanol-ácido acético 3:1). Se deja reposar la muestra a

temperatura ambiente durante 30 minutos. Se centrifugan nuevamente las muestras durante 5 minutos a 3000 rpm, se decanta el sobrenadante y se resuspenden en fijador. Se repite la operación por lo menos en 5 ocasiones. Se resuspende el botón en cantidad mínima de fijador, se toma la muestra con pipeta Pasteur, dejando caer 2-3 gotas de la preparación en laminillas limpias y libres de grasa, desde una altura de 15-20 cms. Se dejan secar al aire. Se tinte una de las laminillas con colorante de Giemsa (3 ml de Giemsa + 47 ml. de amortiguador de fosfato pH 6-8, durante 3 min. Se lavan con agua corriente, se dejan secar las laminillas al aire libre y se observan al microscopio para valorar calidad de las preparaciones.

d).- TECNICA DE BANDAS GTG (113)

Las preparaciones cromosómicas se dejan envejecer una semana. Se colocan las laminillas 5 seg aproximadamente en 3ml de tripsina al 1% + 47ml de amortiguador de fosfatos pH 6.8 a 37° C. Se lavan las laminillas con NaCl 0.9% y después con agua corriente. Se dejan secar al aire libre, se tñen las laminillas con colorante de Giemsa durante 3 minutos y se dejan secar. Finalmente se analizan al microscopio con aumento de 10X.25 X100 un mínimo de 10 metafases. Se toman fotografías de algunas de ellas.

Anexo 1.- CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo----- como padre o tutor del paciente-----
-----, acepto en forma voluntaria que mi familia
participe en el proyecto de investigación " ESTUDIO CLINICO Y
CITOGENETICO DE PACIENTES CON RETINOBLASTOMA DE POBLACION MEXICANA" ,
que realizara la Dra. Margarita Valdés Flores en el servicio de
Genética, del Hospital General de México, SSA. Cuyo objeto es conocer
las características del padecimiento en nuestro medio y proporcionar
asesoramiento genético a mi familia.

Hemos sido perfectamente informados de las características del
estudio, que consistirá en la obtención de 5-10 ml. de sangre venosa
periférica mediante punción venosa. Podremos presentar molestias
mínimas relacionadas con la toma de muestra, como son la formación de
un pequeño hematoma. Es también de nuestro conocimiento que el hecho
de rehusar el estudio, no modificará la calidad de atención que mi
hijo recibe en este hospital.

Al final del estudio se nos proporcionará asesoramiento genético a la
familia.

A T E N T A M E N T E

Nombre-----Firma-----

Dirección-----

Médico responsable-----

Dra. Margarita Valdés F

México, D.F A----- DE-----AÑO

V.-RESULTADOS

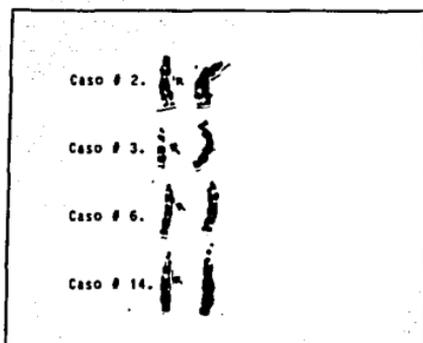
Se analizaron 14 casos de pacientes con retinoblastoma. 7 de ellos de sexo masculino y el resto femenino, siendo la relación de hombre/mujer de 1:1. Los rangos de edad al momento del diagnóstico fueron de 3 meses a 3 años 6 meses. Del total de casos estudiados 11 de ellos (78.57%) no revelaron historia familiar de retinoblastoma, por lo que se consideraron de presentación esporádica. En tres de los casos estudiados encontramos antecedentes familiares de retinoblastoma, dos de ellos con otro miembro afectado y sólo en uno se detectaron otros 3 familiares afectados, dos de ellos fallecidos por complicaciones de retinoblastoma no tratado. En 2 casos más, existen antecedentes familiares de tumores diferentes al retinoblastoma, cuadro X. Las figuras 9-13 muestran la genealogía de estos casos.

En cuanto a la localización ocular del tumor 10(71.42%) fueron unilaterales y 4(28.57%) con afección en ambos globos oculares. Uno de ellos con desarrollo tumoral simultáneo, cuadro X. En 9 de los casos(64.28%), se reportó la presencia de un sólo foco tumoral y en los 5 restantes(35.71%) más de un foco tumoral, cuadro X.

Los signos y síntomas iniciales en todos los pacientes fueron; opacidad en el o los globos oculares afectados, leucocoria, estrabismo, hiperemia conjuntival, movimientos oculares anormales y en 6 casos una franca protrusión ocular a expensas de masa tumoral. Solamente en uno de los casos la Tomografía Axial Computarizada de SNC y órbitas reveló alteraciones secundarias a la presencia de gran masa tumoral, con neoplasia primaria en uno de los globos oculares. En este mismo caso el análisis de líquido cefalorraquídeo mostró la presencia de células tumorales, cuadro IX.

El análisis citogenético se practicó solamente en 10 pacientes y sus padres. En el resto no fue posible debido al manejo en ese momento con agentes antineoplásicos. De los casos estudiados

citogenéticamente 4(28.57%) revelaron la presencia de delección constitutiva de 13q14, cuadro X, figura 14. En uno de los casos la delección fue heredada de uno los progenitores (afectado con retinoblastoma). En la fotografía 1 se muestran los cromosomas del par 13 de los casos con la anomalía citogenética ya señalada.



Fotografía # 1. Pacientes que presentan la
delección constitutiva de
la banda 13q14.

**Cuadro IX. Resultados
Comportamiento genético del retinoblastoma en una muestra de 14
pacientes mexicanos.**

Caso	A / B	C	D	E	F	G
1	3m/M	1a3m	no	no	no	no
2	4m/M	4a	no	si	si	si
3	6m/F	2a6m	no	si	si	si
4	8m/F	1a	no	si	si	ND
5	1a/F	1a4m	si	si	no	no
6	1a/M	4a	si	no	no	si
7	1a3m/M	2a/7m	no	no	no	no
8	1a4m/F	5a	no	si	si	no
9	1a6m/M	2a	si	si	si	ND
10	2a/M	4a	no	si	no	ND
11	2a6m/M	3a	no	si	si	no
12	2a6m/F	3a	no	si	si	no
13	3a/F	4a	no	no	si	ND
14	3a6m/F	4a	no	si	si	si

A= Edad al momento del diagnóstico

a= Edad en años

m= Edad en meses

B= Sexo

C= Edad actual

D= Antecedentes familiares de retinoblastoma

E= Retinoblastoma unilateral

F= Un solo foco tumoral

G= Delección constitutiva de 13q14

Cuadro X. RESULTADOS Comportamiento clínico de una muestra de 14 pacientes mexicanos con retinoblastoma.

Caso	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	-	+	+	+	+	+	+	nl	-	-
2	+	+	+	+	+	+	-	nl	-	-
3	+	+	+	+	+	+	-	nl	-	-
4	-	+	+	+	+	+	+	nl	-	-
5	-	+	+	+	+	+	-	nl	-	-
6	+	+	+	+	+	+	-	nl	-	-
7	-	+	+	+	+	+	-	nl	-	-
8	-	+	+	+	+	+	+	nl	-	-
9	-	+	+	+	+	+	+	nl	-	-
10	-	+	+	+	+	+	+	alt	+	+
11	-	+	+	+	+	+	-	nl	-	-
12	-	+	+	+	+	+	-	nl	-	-
13	+	+	+	+	+	+	-	nl	-	-
14	-	+	+	+	+	+	-	nl	-	-

I.- ANTECEDENTES HEREDO-FAMILIARES

A= Antecedentes heredo-familiares de neoplasias diferentes al retinoblastoma.

II.- DATOS CLINICOS MAS FRECUENTES

B= Opacidad ocular

C= Leucocoria

D= Estrabismo

E= Hiperemia conjuntival

F= Movimientos oculares anormales

G= Protusión ocular

III.-DATOS DE LOS AUXILIARES DE DIAGNOSTICO

H= TAC de cráneo y órbitas

I= Células tumorales en líquido cefalorraquídeo

J= Metastásis a distancia

+ = presencia del dato

- = ausencia del dato

nl = normal

alt= alterado

VI.- DISCUSION

El retinoblastoma es el tumor de origen embrionario más común en la infancia y la causa más frecuente de remoción de globos oculares en esta etapa de la vida. Puede presentarse en forma esporádica o ser heredado. En este último caso, su patrón de herencia es autosómico dominante con 90% de penetrancia. La forma familiar representa 40% de los casos y es causada en su mayoría por mutaciones germinales nuevas. El padecimiento se inicia antes del año de edad, es bilateral y se relaciona con múltiples focos tumorales. Los casos esporádicos se presentan entre el 1er y 5o año, generalmente son unifocales y unilaterales. Los pacientes con retinoblastoma tienen 10% de riesgo de presentar tardíamente otros tipos de tumores mesenquimatosos, principalmente osteosarcomas(9-13,14).

El retinoblastoma se asocia con una anomalía cromosómica específica, la delección constitutiva de 13q14. Esta se encuentra en 10-15% de los casos y se pone de manifiesto con técnicas citogenéticas de alta resolución(81,82). En 1978, se sugirió que el gen responsable del retinoblastoma se localizaba en 13q14(81). Posteriormente, mediante estudios de ligamiento empleando como marcador cromosómico específico el gen de la esterasa D, se logró precisar la región que contenía al candidato a gen del retinoblastoma(84-86). En 1986, se clonó y se le denominó RB1(87). El gen RB1 se asocia también a otro tipo de tumores como carcinomas de mama, ovario, próstata, leucemias y principalmente osteosarcomas(103-105). Las funciones más importantes del producto del gen, p105-110, son la regulación negativa del ciclo celular, la diferenciación terminal de células hematopoyéticas, especialmente de línea eritroide, la diferenciación de los miocitos y el proceso de neurogénesis(88-91,107,108).

El presente estudio analizó clínica y citogenéticamente una muestra de 14 pacientes mestizos mexicanos en edad pediátrica con diagnóstico oftalmológico de retinoblastoma, obteniéndose los siguientes datos: la proporción hombre/mujer fue 1:1. El rango de edad al momento del

diagnóstico fue de 3 meses a 3 años 3 meses. Estos datos son similares a lo reportado en la literatura(74,75).

A pesar de que el retinoblastoma es el motivo más importante de remoción de globos oculares en la infancia, sólo algunos casos son detectados en valoraciones de rutina. En este estudio, el motivo de consulta en 64.28% de los pacientes (casos 2,3,5,6,7,11,12, 13 y 14) fue la presencia de opacidad en el ojo afectado. El resto, (35.72%) de los pacientes (casos 1,4,8,9 y 10) acudieron a consulta por protusión ocular importante, secundaria al gran desarrollo tumoral. En éstos, el retraso en la atención médica se relacionó con la carencia de servicios médicos en las comunidades a las que pertenecen y su bajo nivel socioeconómico.

Las primeras manifestaciones clínicas del padecimiento fueron en todos los casos: leucocoria, estrabismo, movimientos oculares anormales e hiperemia conjuntival. Estos datos concuerdan con lo señalado en la literatura(76-78).

El sitio más frecuentemente afectado por metástasis secundarias al retinoblastoma es el SNC. Esto se debe a que la invasión por células tumorales a coroides y esclera representa un vehículo efectivo a SNC a través del nervio óptico y espacio meníngeo(76-78). Por este motivo, la valoración neurológica, la TAC de cráneo y órbitas, así como el análisis bioquímico y citológico de líquido cefalorraquídeo es indispensable en todos los casos(76-78). En nuestro estudio, solamente uno de los pacientes (caso 10) presentó metástasis en SNC, detectándose por la presencia de células tumorales en líquido cefalorraquídeo.

De acuerdo a lo señalado por Knudson en relación a las características de las neoplasias embrionarias y hereditarias, nuestros resultados son acordes a sus observaciones. La mayoría de los tumores fueron de presentación esporádica, unilateral y unifocal (78.51% de los casos). En estos pacientes los 2 eventos mutacionales requeridos para el desarrollo tumoral debieron ocurrir en las células

de la retina. Sin embargo, en 3 pacientes con presentación esporádica se encontró afección bilateral (casos 1, 7 y 13). El caso 13 presentó un sólo foco tumoral y edad de inicio a los 3 años. Los otros casos (1 y 7) presentaron múltiples focos tumorales, con inicio a los 3 y 15 meses de edad. Es probable que en estos dos últimos pacientes, existiera una mutación germinal, lo cual explicaría la bilateralidad y multifocalidad, ya que los casos con este origen son en su mayoría bilaterales, multifocales y con edad de inicio antes o alrededor del 1er año de vida.

Los retinoblastomas hereditarios representaron 21.42% (casos 5, 6 y 9). De éstos, dos casos mostraron afección unilateral (casos 5 y 9), siendo el primero multifocal y el segundo unifocal. El tercero (caso 6) fue bilateral y multifocal, con edad de inicio antes de los 2 años de edad.

Las neoplasias hereditarias de origen embrionario representan alrededor de 40% de los tumores y son en su mayoría bilaterales, multifocales y con edad de inicio antes del año de edad. En 20-30% de los casos ocurre una primera mutación en células germinales y sólo en 5-10% la mutación es predominantemente heredada. Posteriormente, la segunda mutación ocurre en las células de la retina. De este modo, la primera mutación condicionará el estado heterocigoto y la segunda la pérdida de la misma. Los mecanismos que conducen a la pérdida de heterocigocidad incluyen: pérdida del alelo normal por no disyunción y reduplicación del cromosoma con el alelo mutado, recombinación mitótica anormal, conversión génica, mutaciones puntuales y deleciones (9-13) (fig. 9).

Por otra parte, parecería que la mayoría de las mutaciones germinales son de origen paterno y que algunas se relacionan con "imprinting". Este fenómeno está relacionado con cambios en el patrón de metilación de secuencias específicas de DNA, que condicionan cambios en la expresión de los genes. Esto ocurre durante la gametogénesis y es responsable de las diferencias en los procesos bioquímicos y fisiológicos entre los sexos masculino y femenino (34-39).

Es importante mencionar que 2 de los 3 casos familiares son unilaterales, contrariamente a lo señalado en la literatura. Sin embargo, el tiempo transcurrido a partir de la presentación del tumor, es aún breve (menos de 1 año), por lo que el riesgo, de desarrollo tumoral en el segundo globo ocular es muy alto en estos pacientes.

Como ya se mencionó, en 10-15% de los pacientes con retinoblastoma se detecta la deleción constitutiva 13q14, que representa el primer evento mutacional de acuerdo a lo señalado por Knudson en su modelo de los 2 eventos para la carcinogénesis(9).

De nuestros pacientes estudiados citogenéticamente, 42.85% no reveló la anomalía citogenética (del 13q14) (casos 1,5,7,8,11 y 12) y 28.57% mostraron esta deleción constitutivamente (casos 2,3,6 y 14). En los casos 2,3 y 14 el tumor fue de presentación esporádica, siendo en los pacientes 2 y 3 unilateral, unifocal y con edad de inicio antes del año de edad. La edad de inicio del caso 14 fue a los 3 años 6 meses, muy tardío para lo esperado en casos hereditarios. En el caso 6 no se observó la anomalía citogenética, sin embargo, la madre del paciente, quien presentó retinoblastoma bilateral en la infancia era portadora de la deleción constitutiva. Este es el único de los 14 casos en los que se encontró la anomalía en uno de los progenitores. Desafortunadamente, en los casos 4,9,10 y 13 no fue posible la realización del estudio citogenético debido al manejo en ese tiempo con agentes antineoplásicos. La realización del estudio citogenético de los pacientes y sus padres es importante debido a que permite detectar portadores de la deleción 13q14 y por lo tanto, individuos con riesgo de presentar este tumor. Además, esto permite dar un asesoramiento genético adecuado.

Otro tipo de tumores estuvieron presentes en los familiares de 3 casos (2, 6 y 13). Estas neoplasias relacionadas se señalan en las figuras 11, 13 y 14. Hasta la fecha (marzo de 95), ninguno de los 14 pacientes estudiados, ha presentado neoplasias diferentes al retinoblastoma. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de

que posteriormente presenten otro tipo de tumor, principalmente osteosarcomas. Por este motivo, la vigilancia médica en los pacientes es indispensable durante toda su vida(9-13). Abramson y cols.(115) señalan que 20% de los pacientes presentarán otro tipo de tumor 10 años después, 50% a los 20 años y 90% a los 30 años del diagnóstico de retinoblastoma. Por otra parte, se discute aún, si los familiares de los pacientes con retinoblastoma tienen mayor riesgo de presentar otro tipo de tumores(116, 117). Cabe señalar que en este estudio, la presencia de otras neoplasias fue más frecuente en los casos de presentación esporádica que en los de tipo hereditario.

Por otra parte, se discute aún si los familiares de los pacientes con retinoblastoma tiene mayor riesgo de presentar otro tipo de tumores(116,117). Cabe señalar que en este estudio la presencia de otras neoplasias fue más frecuente en los casos de presentación esporádica.

Finalmente, es importante mencionar que en los últimos años las nuevas técnicas de DNA recombinante, han permitido el estudio molecular en estos pacientes y sus familias, facilitando la identificación del origen real de los casos de presentación esporádica y proporcionar asesoramiento genético correcto a estas familias.

CONCLUSIONES

- 1.- En la muestra de pacientes estudiados no se encontraron diferencias en relación al sexo y edad de presentación en relación a lo señalado en la literatura.
2. La mayor proporción de los casos fueron de presentación esporádica (78.57%), 71.42% mostraron afección en un globo ocular y 64.28% se relacionaron con la presencia de un solo foco tumoral. Sin embargo, es necesario emplear la tecnología molecular para confirmar el origen correcto de los casos identificados como esporádicos ya que algunos podrían ser hereditarios. Esto modificaría el asesoramiento genético proporcionado a la familia de los pacientes.
3. En nuestro estudio, la proporción de casos con la delección 13q14 fue superior a lo señalado en la literatura.
4. Un porcentaje importante de pacientes presentó historia familiar de tumores diferentes al retinoblastoma. Esto sugiere, que el gen RB1 tiene un papel importante en el origen de otro tipo de tumores
5. Es indispensable incluir en el protocolo de estudio y tratamiento de estos pacientes la vigilancia médica durante toda su vida, ya que tienen un riesgo alto de presentar tardíamente otros tumores.

REFERENCIAS

- 1.- Pérez Tamayo R. La célula neoplásica. En Patología Molecular Subcelular y Celular. México. La Prensa Médica Mexicana 1975; 555-570.
- 2.- Knudson AG. Genetics and etiology of human cancer. *Adv Hum Genet.* 1977; 8:1-66.
- 3.- Moolgaukar, Knudson AG. Mutation and cancer. A model for human carcinogenesis. *INCI.* 1981; 66:1037-1052.
- 4.- Klain G, Klein E. Evolution of tumors of tumors and the impact of molecular oncology. *Nature.* 1985; 315:190-195.
- 5.- Trosko JE, Chang CH. Relationship between mutagenesis and carcinogenesis. *Photochem Photobiol.* 1978; 28:157-165.
- 6.- Kalter H. Correlations between teratogenic and mutagenic effects on chemical in mammals. En *Chemical Mutagens Principles and methods for their detection.* USA: De. A Holsaender. 1987; 57-74.
- 7.- Claxton LD, Barry PZ. Chemical mutagenesis. An emerging issue for public health. *Am J Public Health.* 1977;67:1037-1042.
- 8.- Newcombe HB. Problems for assessing the genetic impact of mutagens on man. *Can J Genet Cytol.* 1978; 20:459-464.
- 9.- Knudson AG. Mutation and cancer. Statiscal study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68:820-823.
- 10.- Knudson AG. Germinal and somatic mutations in cancer. In *Proc 5th Int Congr Hum Genet.* México City. Amsterdam. In *Excerpta medica.* 1976;367-371.
- 11.- Cavenee WK, Drya TP, Phillips RA, Benedict WF, Goodbourn R, Gallie BL, Murphree AL, Strong LC, While RL. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 1983;305:779-84.
- 12.- Knudson AG, Strong LC. Heredity and cancer in man. *Prog Med Genet.* 1973;9:113-158.
- 13.- Knudson AG. Genetic predisposition to cancer in man. *Hereditas* 1984;100:171-172.
- 14.- Matsunaga E. Hereditary retinoblastoma. Host resistance and age of onset. *J Natl Cancer Inst.* 1979;63:933-939.

- 15.- Matsunaga E. Hereditary retinoblastoma. Host resistance and second primary tumors. *J Natl Cancer Inst.* 1980;65:47-51.
- 16.- Sassaman EA. Biomedical aspects in Down syndrome. *Oncology*. In *Down Syndrome. Advances in biomedicine and the behavioral Sciences Massachusetts.* Ware Press;1982:237-241.
- 17.- School T, Stein Z. Leukemia and others cancers, anomalies and infections as causes of death in Down syndrome in the United States during 1976. *Devel Med Child Neurol.* 1982;24:817-829.
- 18.- Weinberg MM, Oleinck A. Congenital marrow dysfunction in Down syndrome. *J Pediatr.* 1970;77:273-279.
- 19.- Frauman JF. Constitutional disorders of man predisposing to leukemia and limphoma. *Natl Cancer Inst Monogr.* 1969;32:221-232.
- 20.- Coley GM, Otis RD. Multiple primary tumors including bilateral breast cancer in a man with Klinefelter syndrome. *Cancer* 1971;27:1476-1481.
- 21.- Talerman A. Gonadoblastoma and dysgerminoma in two siblings with disgenetic gonads. *Obstet Gynec.* 1971;38:416-426.
- 22.- Scully RE. Gonadoblastoma. A review of 74 cases. *Cancer* 1970;25:1340-1355.
- 23.- Passarge E, Bartram CR. Somatic recombination as possible prelude to malignant transformation. In *Cancer and genetics New York.* Liss. 1976; 12:177-180.
- 24.- Knudson AG. Genetics of human cancer. *Ann Rev Genet.* 1986;20:231-250.
- 25.- De Vita VT. *Cancer. Principles and Practice of Oncology.* Philadelphia. Lippincott. 1981:1:25.
- 26.- Klein G. The approaching era of the tumor supressor genes. *Science* 1987;238:1539-1545.
- 27.- Knudson AG. Hereditary Cancer, Oncogenes and antioncogenes *Cancer Research* 1985;45:1437-1443.
- 28.- Knudson AG. All in the cancer family. *Nature Genetics* 1993;5:103-104.
- 29.- Sancar A. Mechanisms of DNA excision repair. *Science* 1994;266:1954-60.

- 30.- Michael R B. Genetic immunodeficiency, syndromes with defects in both T and B lymphocyte function. in *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease Vol III*. Chap 129 pp3895-3910
- 31.- Knudson AG. Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad SCI. USA*. 1993;90:10914-10921.
- 32.- Bookstein R, Craig A. Recessive Oncogenes. *Cancer Supplement* 1993;71:1179-1185.
- 33.- Astrin SM, Rothberg PG. Oncogenes and cancer. *Cancer Inv* 1983;1:376-378.
- 34.- Sapienza C. Genome imprinting and dominance modification. *Ann NY Acad Sci* 1989;564:24.
- 35.- Reik W. Genomic imprinting and genetic disorders in man *Trends Genet*. 1989;5:331.
- 36.- Hall JG. Genomic imprinting and its clinical implications *N Engl J Med*. 1992;326:827.
- 37.- Arason A, Barkardottir RB, Egilsson V. Linkage analysis of chromosome 17q markers and breast-ovarian cancer in Iceland families, and possible relationship to prostatic cancer. *Am J Hum Genet*. 1983;52:711-17.
- 38.- Rainer S, Johnson LA, Dobry CJ, Ping AJ, Grundy PE, Feinberg AP. Relaxation of imprinted genes in human cancer. *Nature* 1993;362:747.
- 39.- Feinberg AP. Genomic imprinting and gene activation in cancer. *Nature genetics* 1993;4:110.
- 40.- Hunter T. Oncogenes and cell proliferation. *Curr Op in Gen and Dev USA*. 1993;3:1-4.
- 41.- Zur Hausen H. Viruses in Human Cancers. *Science* 1991;254:1167-1173.
- 42.- Cleary ML. Oncogenic Conversion of trascription factors by chromosomal translocations. *Cell* 1991;66:619-622.
- 43.- Solomon E, Borrow J, Goddard AD. Chromosome Aberrations and Cancer. *Science* 1991;254:1153-1160.
- 44.- Temin HM. On the origen of genes for neoplasia. *Cancer Res* 1974;34:2835.
- 45.- Klein G. The role of gene dosage and genetic transpositions in carcinogenesis. *Nature* 1981;294:313.

- 46.- Blair DG, Oskarsson MK, Wood TG, McClements WL, Fishier PJ, Vande Woude G. A molecular model for oncogenesis. *Science* 1981;212:941.
- 47.- Rowley JD. Human oncogene localitations and chromosome aberrations. *Nature* 1983;301:290.
- 48.- Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R, Soltoff S. Oncogenes and signal transduction. *Cell* 1991;64:281.
- 49.- Aaronson SA. Growth factors and cancer. *Science* 1991;254:1146.
- 50.- Hunter T, Cooper JA. Protein-tyrosine kinases. *Ann Rev Biochem*. 1985;54:897.
- 51.- Cooper GM, Okenquist S, Silverman L. Transforming activity of DNA of chemically transformed and normal cells. *Nature* 1980;284:418.
- 52.- Fasano O, Birnbaum D, Edlund L, Fogh J, Wigler M. New human transforming genes detected by a tumorigenicity assay. *Mol Cell Biol*. 1982;4:1695.
- 53.- Varmus HE. The molecular genetics of cellular oncogenes *Ann Rev Genet*. 1984;18:553.
- 54.- Hyder SM, Stancel GM, Loose-Mitchell DS. Steroid hormone-induced expression of oncogene encoded nuclear proteins. *Critical Rev in Eukaryotic Gene Exp*. 1994;4:55-116.
- 55.- Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Science* 1991;254:1138-1145.
- 56.- Scheiner JW, Gu W, Zhu L, Mahdauj V, Nadal B. Reversal of terminal differentiation mediated by p107 in Rb -/- muscle cells. *Science* 1994;264:1467-70.
- 57.- Pelletier J, Bruening W, Li F, et al. WT1 mutations contribute to abnormal genital system development and hereditary Wilms tumor. *Nature* 1991;353:431
- 58.- Knudson A, Strong L. Mutation and cancer. A model for Wilms tumor of the kidney. *J Natl Cancer Inst*. 1972;48:313.
- 59.- Pendergrass T. Congenital anomalies in children with Wilms tumor, a new survey. *Cancer* 1976;37:403.
- 60.- Miller R, Fraumei J, Manning M. Association of Wilms tumor with aniridia, hemihypertrophy and other congenital malformations. *New Engl J Med*. 1964;270:922.

- 61.- Ping J, Reeve A, Law D, Young M, Boehnke M, Feinberg. Geneting linkage of Beckwith-Wiedemann syndrome to 11p15. *Am J Hum Genet.* 1989;23:165.
- 62.- Hope DG, Mulvihill JJ. Malignacy in neurofibromatosis. *Adv in Neurol* 1981;29:33.
- 63.- Daston MM, Scrable H, Nordlund M, Sturbaum AK, Nissen LM, Ratner N. The protein product of the neurofibromatosis type I gene is expressed at highest abundance in neurons, Schwann cells, and oligodendrocytes. *Neuron.* 1992;8:415.
- 64.- Golubic M, Roudebush M, Dobrowolskiki S, Wolfman A, Stacey DW. Catalytic properties, tissue and intracellular distribution of the native neurofibromatosis type I protein. *Oncogen* 1992;7:2151.
- 65.- Gregory PE, Gutmann DH, Boguski M, Mitchell AM, Parks S, Jacks S, Wood DL, Jove R, Collins FS. The neurofibromatosis type 1 gene product, neurofibromin, associates with microtubules. *Somat Cell Mol Genet.* 1993;19:265.
- 66.- Daston MM, Ratner N. Neurofibromin, a predominantly neuronal GTPase activating protein in the adult, is ubiquitously expresses during development. *Dev Dyn* 1993;19:216.
- 67.- Osborne B, Schwartz LM. Essential genes that regulate apoptosis. *Trends in Cell Biology* 1994;4:394-405.
- 68.- Chen PL, Chen Y, Bookstein R, Lee WH. Genetic mechanisms of tumor suppressor by the human P53 gene. *Science* 1990; 250: 1576-1579.
- 69.- Sager R. Genetic suppression of tumor formation. *Adv in Can Res.* 1985;44:43-68.
- 70.- Boveri T. Zur Frage der Entsehung malignes Tumoren. *Gustav Fisher, Jena* 1914.
- 71.- Caspersson T, Zech L, Johansson C. Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res.* 1970;60:315-319.
- 72.- Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960;132:1497.
- 73.- Devesa SA. The incidence of retinoblastoma. *Am J Ophthalmol* 1975;80:263.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 74.- Jensen RD, Miller RW. Retinoblastoma: Epidemiologic characteristics. *N Eng J Med.* 1971;285:307.
- 75.- Parkin DM, Stiller CA, Draper GJ, Bieber C. The international incidence of childhood cancer. *Int J Cancer* 1988;42:511.
- 76.- Abramson D MD. Retinoblastoma :Diagnosis, treatment and implications. *Pediatric annals.* 1990;19:6-13.
- 77.- Shields JA, Augsburger JJ. Current approaches to the diagnosis and management of retinoblastoma. *Surv Ophthalmol* 1981;25:347.
- 78.- Balmer A, Gaillaud C. Retinoblastoma Diagnosis and treatment. *Dev Ophthalmol.* 1983;7:36.
- 79.- Bader JL, Miller RN, Meadows AT, Zimmerman LE, Champion LAA, Voute PA. Retinoblastoma trilateral. *Lancet* 1980;8194:582
- 80.- Jackobiec FA, Tso M, Zimmerman L, Danis P. Retinoblastoma and intracranial malignancy. *Cancer* 1977;39:2048.
- 81.- Yunis JJ. Retinoblastoma and subband deletion of chromosome 13. *Am J Dis Child* 1978, 32:161-163
- 82.- Francke U. Retinoblastoma and chromosome 13. *Cytogenet Cell Genet* 1976;16:131.
- 83.- Squire J, Gallie BL, Phillips RA. A detailed analysis of chromosomal changes inheritable and non-heritable retinoblastoma. *Hum Genet.* 1985;70:291.
- 84.- Sparkes RS, Sparkes MC, Wilson MG, Towner JW, Benedict WF, Murphree AL, Yunis JJ. Regional assignment of genes for esterase D and retinoblastoma to chromosome band 13q14. *Science.* 1980;208:1042.
- 85.- Sparkes RS, Murphree AL, Lingua RW, Sparkes MC, Field LL, Funderburk SJ, Benedict WF. Gene for hereditary retinoblastoma assigned to human chromosome 13 by linkage analysis to esterase D. *Science* 1983;219:971.
- 86.- Ward P, Packman S, Loughman W, Sparkes RS, Mc Mahon A, Grego T, Abluin A. Location of the retinoblastoma susceptibility gene(s) and the human esterase D locus. *J Med Genet* 1984;21:92.
- 87.- Drya TP, Friend S and Weinberg RA. Isolation of a cDNA fragment derived from human retina mRNA which detects a locus within 13q14 often deleted in retinoblastomas. *Am J Hum Genet.* 1986;39:29.

- 88.- Mihara K, Cao X-R, Yen A, Chandler S, Driscoll B, Murphree AL, Tang A, Fung Y KT. Cell cycle-dependent regulation of phosphorylation of the human retinoblastoma gene product. *Science* 1989;246:1300.
- 89.- Goodrich DW, Wang NP, Yue-Wei-Qian, Y-H-P Eva, Lee W-H. The retinoblastoma gene and product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 1991; 67:293-302.
- 90.- Hamel PA, Gallie BL, Phillis RA. The retinoblastoma protein and cell cycle regulation. *Cell* 1992;8:180-185.
- 91.- Sherr CH J. The ins and outs of RB: coupling gene expression to the cell cycle clock. *Trends in Cell Biol.* 1994;4:15-19.
- 92.- Ewan ME, Sluaa HK, Sherr CH J, Matsushime H, Kato J-Y, Livingston DM. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 1993;73:487-497.
- 93.- Dowdy FS, Hinds PW, Louie K, Reed SI, Arnold A, Weinberg R. Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell* 1993;73:499-511.
- 94.- Kato J-Y, Matsushime H, Hiebert SW, Ewenme, Sherr CH J. Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRB) and pRB phosphorylation by the cyclin D dependent kinase CDK4. *Genes and Dev.* 1993;7:331-342.
- 95.- Shan B, Chang CH-Y, Jones D, LEE W-H. The transcription factor E2F-1 mediates the autoregulation of RB gene expression. *Mol and Cell Biol.* 1994;14:299-309.
- 96.- Nevins JR. E2F: A link between the Rb tumor supresor protein and viral oncoprotein. *Science* 1992;258:424-429.
- 97.- Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989;243:934.
- 98.- Shio Y, Yamamoto T, Yamaguchi N. Negative regulation of Rb expression by the P53 gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:5206-5210.
- 99.- Barbeau D, Charbonneau R, Whalen SG, Bayley ST, Branton PH. Functional interactions within adenovirus E1A protein complexes. *Oncogene* 1994;9:359-373.

- 100.-Matin A, Mien CH-H. The retinoblastoma gene product, Rb represses neu expression through two regions within the neu regulatory sequence. *Oncogene* 1994;9:1333-1339.
- 101.-Dunaief JL, Strober BE, Ghua S, Khavari PA et al. The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest. *Cell* 1994;79:119-130.
- 102.-Hashimoto T, Takahashi R, Yandell DW, Hong J-X, Shi X-H, Gunell S, Benedict WF. Characterization of intragenic deletions in two sporadic germinal mutation cases of retinoblastoma resulting in abnormal gene expression. *Oncogene* 1991;6:463-469.
- 103.-Sachse R, Murakami Y, Shiraishi M, Hayashi K, Sekiya T. DNA aberrations at the retinoblastoma gene locus in human squamous cell carcinomas of the lung. *Oncogene* 1994;9:39-47.
- 104.-Murty VVVS, Bosl GJ, Houldsworth J, Meyers M, Mukherjee AB, Reuter V, Chaganti RSK. Allelic loss and somatic differentiation in human male germ cell tumors. *Oncogene* 1994;9:2245-2251.
- 105.-Kim TM, Benedict WF, Xu H-J, Velicescu M, Yin E, Zheng J, Guerit JZ, Dubeau L. Loss of heterozygosity on chromosome 13 is common only in the biologically more aggressive of ovarian epithelial tumors and is associated with normal retinoblastoma gene expression. *Cancer Research* 1994;5:605-609.
- 106.-Sakai T, Toguchida J, Ohtani N, Yandell DW, Rapaport JM, Dryja TP. Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor suppressor gene. *Am J Hum Genet.* 1991;48:880-888.
- 107.-Eva Y, Chi C, Nanpin H, et al. Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature* 1992;359:288-294.
- 108.-Tyler J, Fazeli A, Schmitt E, et al. Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* 1992;359:295-300.
- 109.-Defeo J, Huang PS, Jones RE, Haskell KM, Vuocolo GA, Hanobik MG, Huber HE, Oliff A. Cloning of cDNA for cellular proteins that bind to the retinoblastoma gene products. *Nature* 1991;352:251-254.
- 10.-Mayol X, Grana X, Baldi A, Sang N, Giordano A. Cloning of a new member of the retinoblastoma gene family (pRB2) which binds to the E1A transforming domain. *Oncogene* 1993;8:2561-2566.

- 111.-Yeung RS, Bell DW, Testa JR, Mayol X, Baldi, Grana X, Levan K, Knudson AG, Giordano A. The retinoblastoma related gene RB2, maps to human chromosome 16q11 and rat chromosome 19. *Oncogene* 1993;8:3465-3468.
- 112.-Iannuzzi L, Gustavsson Y, Pia di meo G, Ferrara L. High resolution studies on late replicating segments (G+C bands) in mammalian chromosomes. *Hereditas*. 1989;110:43-50.
- 113.-Verma RS, Babu A. Human Chromosomes, Principles and Techniques. Mc Graw Hill, Second Edition 1995.
- 114.-Falls HF, Neal JV. Genetics of retinoblastoma. *Arch Ophthalmol*. 1951;151:197.
- 115.-Abramson DH, Ellsworth RM, Kitchin FD, Tung G. Second non-ocular tumors in retinoblastoma survivors. Are they radiation-induced. *Ophthalmology* 1984;91:1351.
- 116.-Sanders BM, Jay M, Draper GL, Roberts EM. Non ocular cancer in relatives of retinoblastoma patients. *Br. J Cancer* 1989;60:358-365.
- 117.-Olsen JH, Winter J, Nully BP. Risk of non ocular cancer in first degree relatives for retinoblastoma patients. *Hum Genet* 1990;85:233.